

MORPHOLOGISCHE
UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG
VON BLUTLYMPHOZYTEN BEI NORMALPERSONEN
UND BEI CHRONISCHER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE

Angelika Kreppel

1970

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN,
SPEZ. HÄMATOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Komm. Leiter: Prof. Dr. R. Marx

MORPHOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG
VON BLUTLYMPHOZYTEN BEI NORMALPERSONEN UND BEI
CHRONISCHER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Kreppel
aus
Ottobrunn

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Huhn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 12. 1978



Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
A. EINLEITUNG	1
I. Der Lymphozyt bei Normalpersonen	1
1. Abstammung und Funktion	1
2. Immunologische Merkmale	1
a. B-Lymphozyten	2
b. T-Lymphozyten	2
3. Morphologie	3
a. Der große Lymphozyt	3
b. Der kleine, helle Lymphozyt	4
c. Der kleine, dunkle Lymphozyt	4
d. Der plasmazelluläre Lymphozyt	5
II. Der Lymphozyt bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL)	5
1. Klinisches Bild	6
2. Immunologische Merkmale	6
a. B-Lymphozyten bei CLL	7
b. T-Lymphozyten bei CLL	8

3. Morphologie	8
a. B-Zell-CLL	8
b. T-Zell-CLL	9
III. Fragestellung	9
B. MATERIAL UND METHODEN	11
I. Versuchspersonen	11
1. Gesunde Versuchspersonen	11
2. Versuchspersonen mit CLL	11
II. Verwendete Immunseren	13
1. Anti-T-Zell-Globulin	13
2. Anti-Kaninchen-IgG-Globulin	14
3. Gegen menschliches IgG gerichtetes Globulin	15
4. Kaninchen-Normal-IgG	15
III. Versuchsbeschreibung	16
1. Bezugsquellen der verwendeten Substanzen	16
2. Blutentnahme	16
3. Lymphozytenisolierung	17

4. Konjugation von IgG und Peroxidase	18
5. Spezifische Inkubation der Lymphozyten	18
6. Sandwich-Inkubation der Anti-T-Zell-Globulin und Kaninchen-Normal-IgG inkubierten Lymphozyten	19
7. Fixierung	19
8. Peroxidase-Reaktion	20
9. Nachfixierung	20
10. Dehydrierung	20
11. Einbettung	21
12. Schneiden	21
13. Färbung	21
14. Zahl der Versuche und Auswertung	22
 IV. Statistische Methoden	 23
 C. ERGEBNISSE	 24
 I. Quantitative Werte	 24
1. Normalpersonen	24
2. CLL-Patienten	25
a. B-Zell-CLL	25
b. T-Zell-CLL	27
3. Kontrollen	27

II. Morphologische Befunde	29
1. Verteilung der Zellorganellen in B- und T-Lymphozyten bei Normalpersonen	29
2. Verteilung der Zellorganellen in B- und T-Lympho- zyten bei Patienten mit B- und T-Zell-CLL	29
3. Vergleich der Verteilung von Zellorganellen in B- und T-Lymphozyten bei Normalpersonen mit der von B- und T-Lymphozyten bei Patienten mit entsprechender CLL	30
III. Abbildungen	31
D. DISKUSSION	37
I. Quantitative Werte	37
II. Morphologische Befunde	43
E. ZUSAMMENFASSUNG	52
F. LITERATURVERZEICHNIS	53

A. EINLEITUNG

I. Der Lymphozyt bei Normalpersonen

1. Abstammung und Funktion

Der Fortschritt der Immunologie in den letzten Jahren hat wesentlich zur Aufklärung der Lymphozytenfunktion beim Menschen beigetragen. Es darf heute als gesichert gelten, daß der regelrechte Ablauf der zellulären und humoralen Immunantwort von der Anwesenheit und Funktionsfähigkeit immunkompetenter Lymphozyten abhängt. Die thymusabhängigen T-Lymphozyten, deren Differenzierung und Reifung sich unter dem Einfluß des Thymus vollziehen, sind die Träger der zellulären Immunität. Diejenigen Zellen, deren Entwicklung und Prägung in einem der Bursa Fabricii der Vögel äquivalenten Organ - möglicherweise dem Knochenmark - stattfinden, werden als thymusunabhängige B-Lymphozyten bezeichnet. Sie vermitteln die humorale Immunität (1, 40, 41, 62, 63, 86, 88, 91, 105, 110, 112).

2. Immunologische Merkmale

Diese genaue Unterscheidung der Abstammung und Funktion von zumindest zwei heterogenen Lymphozytenpopulationen wird aufgrund der verschiedenen spezifischen Membraneigenschaften der B- und T-Lymphozyten erleichtert. Der Nachweis der Existenz von unterschiedlichen Membranmarkern für die beiden Lymphozytengruppen gelang zunächst

in Tierversuchen (13, 14, 19, 25, 71, 72, 95, 103, 104, 137). Die Zweiteilung des lymphatischen Systems bestätigte sich bei gleichartigen Versuchen mit menschlichen Lymphozyten.

a. B-Lymphozyten

Folgende Membraneigenschaften und Methoden werden heute vorwiegend zur Charakterisierung menschlicher B-Lymphozyten herangezogen:

α . Sie tragen Immunglobulindeterminanten an ihrer Zelloberfläche, die mit spezifischen Immunseren dargestellt werden (35, 58, 64, 67, 77, 113, 141).

β . Sie besitzen den Fc-Rezeptor, der durch Bindung an aggregiertes Gamma-Globulin und Antigen-Antikörper-Komplexe nachgewiesen wird (45, 66, 140).

γ . Ein Rezeptor für Komplement (C 3) ist vorhanden, zu dessen Darstellung die Rosettenbildung durch mit Antikörpern und Komplement beladene Erythrozyten angewandt wird (87, 114, 125).

Der mit diesen Methoden ermittelte Anteil von B-Lymphozyten im Blut des gesunden Erwachsenen wird mit 10 - 20 % angegeben (60, 84).

b. T-Lymphozyten

Für die heute gebräuchliche Darstellung menschlicher T-Lymphozyten sind folgende Membraneigenschaften und Methoden von Bedeutung:

α . T-Lymphozyten besitzen einen Rezeptor für Schafererythrozyten, da sie in der Lage sind, spontan Rosetten mit Schafererythrozyten zu bilden (16, 36, 55, 59, 78, 121, 143).

β. Die Zelloberfläche trägt Membranantigene, die mit hochspezifischen Antiseren erfaßt werden können (3, 6, 20, 128). Mit diesen Methoden konnte gezeigt werden, daß etwa 80 - 85 % der menschlichen Blutlymphozyten des gesunden Erwachsenen zur Gruppe der T-Lymphozyten gehören (28, 84).

3. Morphologie

In zahlreichen elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde die ultrastrukturelle Morphologie der Lymphozyten beschrieben. Folgende Lymphozyten sind morphologisch voneinander abzugrenzen (18, 49, 50, 69, 146):

a. Der große Lymphozyt

Er hat 10 - 20 % Anteil an den Gesamtlymphozyten des peripheren Blutes beim gesunden Erwachsenen. Sein Durchmesser beträgt 7 - 10 μm . Der Kern hat aufgrund zahlreicher kleiner Einbuchtungen kein regelmäßiges Profil; das Chromatin liegt dicht gepackt mit Niederschlägen entlang der inneren Kernmembran, von helleren Zonen unterbrochen, die jedoch keine scharfen Übergänge bilden. Der Nucleolus ist groß. Das Zytoplasma ist ziemlich klar und hell, es enthält wenig Glykogen. Ribosomen sind selten und wenn vorhanden, meist in Rosetten als Polyribosomen angeordnet. Mitochondrien sind nicht häufig und klein. Einige ziemlich lange Ergastoplasmaschläuche sind charakteristisch für diese Zellart. Der Golgi-Apparat ist klein und umschließt eine oder zwei Zentriolen, die im Zentrum der Zelle liegen. Ein oder zwei kleine Lysosomen sind meist

vorhanden. Außerdem sieht man multivesikuläre Strukturen und zahlreiche Mikrotubuli.

b. Der kleine, helle Lymphozyt

Sein Prozentsatz an den Gesamtlymphozyten des peripheren Blutes beim gesunden Erwachsenen beträgt 70 - 80 %. Der Durchmesser liegt meist unter $7\text{ }\mu\text{m}$. Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des Kerns verschoben. Der rundliche oder bohnenförmige Kern beinhaltet kompakte Chromatinmassen, die einen kleinen Nucleolus verbergen. Das Zytoplasma ist hell. Ribosomen findet man nur sporadisch; sie sind teilweise in Rosetten angeordnet. Die Mitochondrien sind groß mit einem Durchmesser von $0,4 - 0,7\text{ }\mu\text{m}$. Ergastoplasmaschläuche fehlen meist ganz. Der Golgi-Apparat umschließt die Zentriolen und liegt in der Kerneinbuchtung. Dort findet man auch zwei klar unterscheidbare Gruppen von Zytosomen: Granula verschiedenen Durchmessers ($0,3 - 0,5\text{ }\mu\text{m}$) von einer feinen granulären, sehr elektronendichten Struktur; sowie verhältnismäßig große Körper, deren Inneres homogen und weniger dicht erscheint. Vesikel und multivesikuläre Strukturen sind bei dieser Lymphozytenart zahlreich.

c. Der kleine, dunkle Lymphozyt

Diese Zellart macht unter den Lymphozyten des peripheren Blutes beim gesunden Erwachsenen nur einige Prozent aus. Der Durchmesser beträgt $6 - 7\text{ }\mu\text{m}$. Die Kern-Plasma-Relation ist noch mehr zugunsten des Kerns verschoben. Das Chromatin erscheint dicht, die Nucleolen sind sichtbar. Das Zyto-

plasma umgibt den Kern in einem schmalen Saum. Es ist dicht mit Ribosomen besetzt, somit von großer elektronenoptischer Dichte, die die Matrix der wenigen Mitochondrien klar erscheinen läßt. Andere Zellorganellen sind selten.

d. Der plasmazelluläre Lymphozyt

Die Häufigkeit im peripheren Blut des gesunden Erwachsenen liegt bei ungefähr 2 %. Der Durchmesser liegt bei 8 μ m. Der Kern ist nahezu vollkommen von konzentrisch angeordneten, teilweise erweiterten Ergastoplasmazisternen eingeschlossen.

Eine allein auf morphologischen Merkmalen beruhende Einteilung der Lymphozyten erlaubt keine sichere Zuordnung zur B- oder T-Lymphozytengruppe (76). Hierfür sind kombinierte immunologisch-morphologische Untersuchungen erforderlich.

Diese Darstellung der immunologischen und morphologischen Merkmale von Lymphozyten gesunder Normalpersonen zeigt, welche Bedeutung die Immunologie für die Lymphozytenforschung gewonnen hat.

II. Der Lymphozyt bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL)

Gleiches gilt für die lymphatischen Systemerkrankungen, die dank der neuen Kenntnisse und Methoden heute besser verstanden und klassifiziert werden können. Zu diesen lymphatischen Systemerkrankungen gehört

die chronische lymphatische Leukämie.

1. Klinisches Bild

Die CLL ist eine maligne lymphoproliferative Erkrankung. Sie ist durch eine erhebliche Zunahme der Lymphozyten im Knochenmark, im Blut sowie im lymphatischen Gewebe gekennzeichnet (24). Die Krankheit beginnt meist zwischen dem 40. und 60. Lebensjahrzehnt und verläuft relativ mild, weswegen sie zur Gruppe der "low-grade-malignancies" gehört. Patienten mit CLL weisen Lymphknoten- und Milzschwellung, selten auch Hautveränderungen auf (99). Im Differentialblutbild ist der Prozentsatz der Lymphozyten erhöht (108).

2. Immunologische Merkmale

Von zahlreichen Autoren wurde festgestellt, daß die Zellen in den weitaus meisten Fällen von CLL B-Zell-Charakter haben (2, 7, 10, 37, 57, 65, 81, 93, 97, 127, 142). Hingegen wurden chronische lymphatische Leukämien mit T-Zell-Charakter nur von einigen wenigen Autoren beschrieben. Diese CLL-Form ist eine sehr seltene Erkrankung, deren Häufigkeit wahrscheinlich bei weniger als 5 % der gesamten Fälle von CLL liegt (17, 26, 29, 31, 74, 83, 131, 135, 145). Zum Nachweis der B- oder T-Zellnatur werden die gleichen immunologischen Methoden wie zur Darstellung normaler B- oder T-Lymphozyten verwendet.

a. B-Lymphozyten bei CLL

Die Lymphozyten der B-Zell-CLL sind durch folgende immunologische Merkmale charakterisiert:

α. Ihre Zelloberfläche ist mit Immunglobulinmolekülen besetzt, die meist bei über 70 % der peripheren Lymphozyten nachweisbar sind. Vorwiegend handelt es sich um die Immunglobulinklasse M. Die Oberflächenimmunglobuline liegen beim jeweiligen Patienten in monoklonaler Form vor, sie sind auf einen Leicht- oder Schwer-Ketten-Typ beschränkt. Die Dichte der Immunglobuline auf der Oberfläche ist gegenüber normalen B-Zellen vermindert (2, 38, 39, 45, 96, 101, 141).

β. Sie besitzen den Fc-Rezeptor, dessen Vorkommen und Häufigkeit noch nicht einheitlich beurteilt werden kann (10, 45, 66, 100).

γ. Sie haben einen Rezeptor für Komplement (C 3), dessen Bedeutung ebenfalls noch unterschiedlich beurteilt wird (98, 124).

Der mit diesen Methoden ermittelte Anteil von B-Lymphozyten im Blut von Patienten mit B-Zell-CLL wird mit 60 - 90 % angegeben (38, 100).

Die aufgeführten Untersuchungsergebnisse zeigen, daß zur Darstellung von B-Lymphozyten bei B-Zell-CLL die gleichen immunologischen Merkmale wie bei normalen B-Lymphozyten herangezogen werden, daß diese Eigenschaften bei CLL-Patienten zum Teil verändert sind und auf eine Funktionseinschränkung der Zellen hinweisen (136).

b. T-Lymphozyten bei CLL

Die Lymphozyten der T-Zell-CLL weisen immunhistochemisch folgende Merkmale auf:

α. Sie bilden spontan Rosetten mit Schafererythrozyten (16, 17, 29, 45, 74, 122, 134, 143).

β. Außerdem gelingt der T-Zell-Nachweis mit spezifischen Anti-T-Zell-Seren, die mit den Antigenen auf der Zelle reagieren (3, 74, 83, 135, 145).

Bei einer CLL mit T-Zell-Charakter weisen 70 - 80 % der Gesamtlymphozyten diese Merkmale von T-Lymphozyten auf (74, 145).

3. Morphologie

Diesen zahlreichen immunologischen Untersuchungen der Lymphozyten bei CLL stehen nur wenige Arbeiten gegenüber, die sich mit der ultrastrukturellen Morphologie der peripheren Lymphozyten bei CLL befassen (30, 38, 70, 119, 120, 148).

a. B-Zell-CLL

Dabei konnten keine konstanten, charakteristischen Veränderungen der B-Lymphozyten bei CLL sicher nachgewiesen werden. Die Untersucher stellten jedoch einige Besonderheiten an CLL-Lymphozyten fest, die erwähnt werden sollen: Der Kern ist unregelmäßiger geformt und gelappt. Nucleolen sind häufiger und oft auffallend groß. Die Kerne zeigen teilweise pilzförmige Auftreibungen und Aufbrüche der Kernmembran. Der Zytoplasmasaum ist schmaler als bei normalen Zellen. Die Mitochondrien sind häufig vermehrt

und vergrößert, ihre Matrix ist gelegentlich auffallend dunkel, was auf eine gesteigerte Aktivität dieser Zellorganellen zurückgeführt wird. Als Zeichen degenerativer Veränderung treten Myelinfiguren und Zytolysosomen auf.

b. T-Zell-CLL

Bei den wenigen bisher elektronenoptisch untersuchten Fällen von T-Zell-CLL stellte man zum einen morphologisch unauffällige kleine Lymphozyten fest, die den beschriebenen der B-Zell-CLL gleichen (75), die aber durch weitaus größeren Polymorphismus auffallen: in einigen Zellen sind die Kerne sehr gelappt; große Zytosomen treten in zahlreichen Zellen auf; in anderen Lymphozyten sind große Einschlüsse von Glykogen zu beobachten (74). Andere Autoren fanden bevorzugt größere Lymphozyten mit auffallend vielen und großen Azurgranula (27, 123). Aufgrund dieser wenigen, nicht signifikanten und konstanten Unterschiede ist es nicht möglich, Lymphozyten bei B-Zell-CLL von denen bei T-Zell-CLL allein morphologisch sicher zu unterscheiden.

III. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit sollte die Frage beantworten, ob folgende vier Lymphozytenpopulationen sich aufgrund morphologischer Befunde unterscheiden lassen:

1. B-Lymphozyten des Gesunden
2. T-Lymphozyten des Gesunden

3. B-Lymphozyten bei B-Zell-CLL

4. T-Lymphozyten bei T-Zell-CLL

Hierfür wurden B-Lymphozyten durch Peroxidase-konjugiertes, gegen menschliches Immunglobulin gerichtetes Antiglobulin markiert; T-Lymphozyten durch gegen T-Lymphozyten-Antigen gerichtetes Immunglobulin markiert. Der Organellengehalt der so gekennzeichneten B- und T-Lymphozyten wurde im Elektronenmikroskop bestimmt. Die vier Lymphozytengruppen wurden bezüglich ihres durchschnittlichen Organellengehaltes pro Einzelzelle verglichen.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Versuchspersonen

Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten aus heparinisiertem Venenblut von gesunden Personen und von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) vorgenommen.

1. Gesunde Versuchspersonen

Das Alter der zwei weiblichen und zwei männlichen Versuchspersonen lag zwischen 28 und 48 Jahren. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren sie klinisch gesund und nahmen keine Medikamente ein, die Einfluß auf die durchzuführende Untersuchung hatten.

2. Versuchspersonen mit CLL

Die acht untersuchten Patienten entstammten dem Krankengut der I. und II. Medizinischen Klinik der Universität München. In der Tabelle 1 sind die Daten der Versuchspersonen mit CLL zum Zeitpunkt der Untersuchung aufgeführt.

Tabelle 1

Klinische Daten der Patienten mit B-CLL (1 - 7) und T-CLL (8)

Patient, Geburtsjahr	1.GW,1905	2.PB,1909	3.WM,1913	4.EK,1912
Leukozyten/mm ³	63.000	78.000	79.000	91.250
% Lymphozyten im Differentialblutbild	93	>90	96	94
Thrombozyten/ μ l Blut	85.000	75.000	6.000	187.000
Hb g %	7,6	9,3	6,6	11,0
IgG mg %	486	763	663	1082
IgA mg %	41	39	38	35
IgM mg %	<40	<40	126	218
Lymphknotenschwellung	+++	+++	+++	++
Milzvergrößerung	++	+++	++	++
Knochenmarkinfiltrate	++	++	+++	+++
Therapie	Bestrahl.	Zellsepar	Bestrahl. Ultralan ^R	Zellsep ^R Urbason ^R

Patient, Geburtsjahr	5.MW,1910	6.WR,1903	7.RS,1907	8.KP,1897
Leukozyten/mm ³	53.390	48.300	140.000	28.130
% Lymphozyten im Differentialblutbild	90	94	96	90
Thrombozyten/ μ l Blut	106.000	163.000	98.000	9.000
Hb g %	12,5	12,6	-	8,3
IgG mg %	899	665	-	991
IgA mg %	61	86	-	211
IgM mg %	47	<40	-	45
Lymphknotenschwellung	++	+++	++	+++
Milzvergrößerung	+++	+++	+++	++
Knochenmarkinfiltrate	++	++	++	+
Hautinfiltrate	-	-	-	+++
Therapie	Bestrahl. Favistan ^R	-	-	Leukeran ^R

II. Verwendete Immunsereen

1. Anti-T-Zell-Globulin (ATCG) (111)

Kaninchen wurden an drei Stellen subkutan 10^8 gewaschene menschliche Thymozyten oder Thymomzellen - in 1,5 ml Kochsalzlösung suspendiert - unter Zusatz einer gleichen Menge von komplettem Freund's Adjuvant injiziert. Eine Booster-Impfung der Tiere fand 14, 15, 16 und 23 Tage nach der Erstimmunisierung statt. Weitere sieben Tage später wurden die Kaninchen entblutet und die gewonnenen Seren bei -20°C aufbewahrt. Zur Weiterverwendung wurde das Antithymozytenserum bei 56°C 30 Minuten hitzeinaktiviert. Die Absorption des Serums wurde bei 4°C 30 Minuten lang mit menschlichem Nierenhomogenat, CLL-Zellen und einem Pool verschiedener lymphoblastoider Zelllinien vom B-Zell-Typ nach folgenden Methoden durchgeführt: Menschliche Niere wurde in einem gekühlten Homogenisator (Cenco) homogenisiert und dreimal mit Kochsalzlösung gewaschen. Die CLL-Zellen, von mit einem IBM-Zellseparator behandelten Patienten gewonnen, wurden dreimal in Kochsalzlösung gewaschen, ohne verunreinigende Erythrozyten wieder aufzuwirbeln (10 % Erythrozyten in der Gesamtmenge). Absorptionen wurden einmal mit Nierenhomogenat und dreimal mit CLL-Zellen - von drei verschiedenen Patienten gewonnen - in einem Gewichtsverhältnis von Sediment : Serum von 1 : 2 ausgeführt. Ein niedriger Prozentsatz von Lymphozyten, die spontan mit Schafererythrozyten Rosetten bildeten war bei

der Auswahl der CLL-Zellen maßgeblich. Schließlich wurde das Serum einmal mit einem Pool lymphoblastoider Zelllinien absorbiert. Nach diesen Absorptionen konnten keine Kreuzreaktionen mit menschlichen Erythrozyten oder mit Immunglobulin mehr festgestellt werden. Nach der letzten Absorption wurde das Serum 30 Minuten lang bei 10.000 x g ultrazentrifugiert (Beckman Spinco). Die Isolierung der IgG-Fraktion des Anti-T-Zell-Serums wurde durch Ammoniumsulfat-Präzipitation und DEAE-Zellulose-Ionenaustauscherchromatographie erreicht (53), die Konzentration wurde auf 5 mg/ml eingestellt. In zahlreichen Versuchen wurde die Spezifität des ATCG überprüft. In der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) betrug der Titer gegenüber Thymus-Lymphozyten und gegen Spontanrosetten bildende Zellen der MOLT-4-Zelllinie 1 : 128. Ein negativer Titer lag gegen CLL-Lymphozyten und gegenüber Immunglobulin bildenden Lymphozyten aus einer B-Zell-Kultur vor.

2. Anti-Kaninchen-IgG-Globulin (AKanIg) (111)

Hammeln wurde an vier Stellen subkutan 5 mg Kaninchen-IgG unter Zusatz von komplettem Freund's Adjuvant injiziert. Danach wurden drei weitere Immunisierungen in 14-tägigen Intervallen ohne Zusatz von Freund's Adjuvant durchgeführt. Sieben Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet. Nach einer Hitzeinaktivierung wurde das gewonnene Serum einmal mit menschlichen Milzzellen (10^8 Zellen/ml) absorbiert. Die Isolierung der IgG-Fraktion

erfolgte durch Ammoniumsulfat-Präzipitation und DEAE-Zellulose-Ionenaustauscherchromatographie. Die Konzentration von IgG wurde auf 5 mg/ml eingestellt. Der Antikörpertiter des Serums gegen Kaninchen-Ig betrug 1 : 6000, der der IgG-Lösung in der passiven Hämagglutination gegenüber IgG-beladenen Hammelerythrozyten 1 : 8000.

3. Gegen menschliches IgG gerichtetes Globulin (AHumIg) (111)
Kaninchen wurde an drei Stellen subkutan 1 mg menschliches IgG unter Zusatz von komplettem Freund's Adjuvant injiziert. Die Injektionen wurden ohne Zusatz von Freund's Adjuvant nach 14, 21 und 28 Tagen wiederholt. Das Blut wurde den Tieren weitere sieben Tage später entnommen. Danach erfolgte Hitzeinaktivierung des gewonnenen Serums und Absorption mit menschlichen Milzzellen. Die Isolierung der IgG-Fraktion wurde durch Ammoniumsulfat-Fällung und DEAE-Zellulose-Ionenaustauscherchromatographie erreicht. Die Konzentration von IgG wurde auf 5 mg/ml eingestellt. Der Antikörpertiter betrug in der passiven Hämagglutination gegenüber IgG-beladenen Hammelerythrozyten 1 : 4000, gegenüber IgM-beladenen 1 : 2000.

4. Kaninchen-Normal-IgG (Kan-N)

Kaninchen-Normalserum wurde mit menschlichen Milzzellen absorbiert. Die Fraktionierung des IgG-Anteils erfolgte wiederum durch Ammoniumsulfat-Präzipitation

und DEAE-Zellulose-Ionenaustauscherchromatographie.

III. Versuchsbeschreibung

1. Bezugsquellen der verwendeten Substanzen

- | | |
|--|---|
| a. Fa. Boehringer, Mannheim | : Meerrettich-Peroxidase |
| b. Fa. Fluka, Schweiz | : 3,3'-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid,
Tris-Puffer |
| c. Fa. GIBCO, USA | : Eagle's Minimum
Essential Medium |
| d. Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach | : Liquemin 5000 ^R |
| e. Klinikapotheke der Universität
München | : Ficoll-Isopaque |
| f. Fa. Merck, Darmstadt | : Na-Cacodylat-Puffer,
Veronal-Acetat-Puffer,
Osmiumtetroxid,
Alkohole, Propylenoxid |
| g. Fa. Serva, Heidelberg | : Glutaraldehyd, Maraglas |

2. Blutentnahme

Plastipak-Einmal-Spritzen wurden mit 50 I. E. Liquemin^R/ml benetzt. Das Blut wurde den Testpersonen durch Punktion der vena cubitalis steril entnommen und möglichst schnell weiterverarbeitet. Pro Versuchsansatz wurden 10 ml Blut verwendet.

3. Lymphozytenisolierung (21)

Das heparinisierte Blut wurde vorsichtig von der Spritze in einen Erlmeyer-Kolben übertragen. Durch langsames Zufließenlassen von Minimum Essential Medium (MEM), pH 7,35 - 7,4, wurde es im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. In einem 50 ml Zentrifugenglas wurde ein Teil auf Zimmertemperatur erwärmtes Ficoll-Isopaque (D = 1,077 g/ml bei 20°C) mit einem gleichen Teil Blut langsam überschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 1000 x g von 20 Minuten Dauer in einer Hettich-Zentrifuge konnte die lymphozytenreiche Schicht - deutlich als trüber Ring im klaren Plasma erkennbar - mit einer Pasteur-Pipette abgehoben und in ein 20 ml Zentrifugenglas übertragen werden. Zu den abpipettierten Lymphozyten wurde die dreifache Menge MEM gegeben und gut resuspendiert. Darauf folgten drei Zentrifugationen: die erste bei 500 x g 10 Minuten lang; die zweite bei 500 x g 10 Minuten lang; die dritte bei 300 x g 10 Minuten lang. Zwischen den einzelnen Zentrifugiervorgängen in der Hettich-Zentrifuge wurde das Sediment - der Überstand wurde verworfen - jedesmal wie oben beschrieben mit MEM ausgewaschen und resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das MEM abpipettiert und das Zellsediment in der Neubauer-Zählkammer auf 1×10^7 Lymphozyten/ml eingestellt. Zur Überprüfung der Reinheit der Lymphozytenpräparation wurden nach Pappenheim gefärbte Ausstriche untersucht.

4. Konjugation von IgG und Peroxidase (11, 12, 61, 132)
Jeweils 40 mg A_{Kan}Ig bzw. A_{Hum}Ig und 96 mg Meerrettich-Peroxidase (lyophilisiert und salzfrei) wurden in 8 ml Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,0, gelöst. Unter ständigem Rühren wurden 0,4 ml einer 1%igen Glutaraldehydlösung tropfenweise hinzugefügt, das Gemisch 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt und dann gegen phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung (PBS) dialysiert. Die nicht gebundene Peroxidase wurde durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat-Lösung entfernt. Das Präzipitat wurde zweimal mit 50%iger gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen und anschließend in 16 ml PBS resuspendiert. Darauf folgte eine Ultrazentrifugation von 30 Minuten Dauer bei 10.000 x g (Beckman Spinco) und eine 24-stündige Dialyse gegen 5 l PBS mit zweimaligem Wechsel. Die Proteinkonzentration wurde auf etwa 10 mg/ml eingestellt.

5. Spezifische Inkubation der Lymphozyten

Jeweils etwa 10^7 Lymphozyten wurden in MEM bei 4°C 25 Minuten lang mit ATCG, Kan-N oder mit Peroxidase-konjugiertem A_{Hum}Ig (A_{Hum}Ig-Pox) bzw. mit Peroxidase-konjugiertem Kan-N (Kan-N-Pox) als Kontrolle unter gelegentlichem Schütteln in kleinen Reagenzgläsern inkubiert. Die Endkonzentration von ATCG und Kan-N betrug je 2 mg/ml Inkubationslösung, die von A_{Hum}Ig-Pox und Kan-N-Pox je 4 mg/ml Inkubationslösung. Die

Immunglobulin-Lösungen wurden jeweils vor Gebrauch 10 Minuten lang bei 10.000 x g ultrazentrifugiert (Beckman Spinco), um eventuell vorhandene Immunglobulinpräzipitate zu entfernen. Nach der spezifischen Inkubation wurden die Lymphozyten dreimal bei 4°C in MEM gewaschen und dazwischen jeweils bei der gleichen Temperatur 1 - 2 Minuten lang bei 3000 x g in einer Christ-Zentrifuge zentrifugiert.

6. Sandwich-Inkubation der ATCG- und Kan-N-inkubierten Lymphozyten

Die Lymphozyten wurden bei 4°C 25 Minuten lang mit Peroxidase-konjugiertem AKanIg (AKanIg-Pox) inkubiert. Die Endkonzentration von AKanIg-Pox betrug 0,005 mg/ml Inkubationslösung. Danach wurden die Lymphozyten dreimal bei 4°C in MEM gewaschen und dazwischen wie unter Punkt 5 beschrieben, zentrifugiert.

7. Fixierung (116)

Alle Proben wurden eine Stunde lang bei 4°C in 2,5%iger Glutaraldehydlösung (in Na-Cacodylat-Puffer, 0,1 M, pH 7,4 und 1 % Saccharose) fixiert. Anschließend wurden sie dreimal bei 4°C in Na-Cacodylat-Waschpuffer (Na-Cacodylat-Puffer, 0,1 M, pH 7,4 und 7 % Saccharose) gewaschen, dazwischen wie unter Punkt 5 beschrieben zentrifugiert und über Nacht in der Pufferlösung aufbewahrt.

8. Peroxidase-Reaktion (79)

Die Inkubation aller Proben erfolgte 25 Minuten lang bei Zimmertemperatur unter mehrmaligem Resuspendieren in 10 ml Tris-Puffer, 0,05 M, pH 7,6, mit 5 mg 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid, 0,1%iger H_2O_2 und 5 % Saccharose. Die Lösung war stets frisch bereitet und auf pH 7,6 eingestellt. Anschließend wurden die Proben dreimal in Veronal-Acetat-Puffer, pH 7,4 und 7,5 % Saccharose, ausgewaschen und dazwischen wie unter Punkt 5 beschrieben, zentrifugiert. Nach dem letzten Auswaschen wurde das Sediment in Polyäthylen-Mikrotest-Röhrchen übertragen und 5 Minuten lang bei 10.000 x g in einer Beckman Spinco Microfuge ultrazentrifugiert.

9. Nachfixierung (92)

Sie erfolgte 2 Stunden lang bei 4°C in 1%iger Osmiumtetroxid-Lösung (1 Teil OsO_4 : 1 Teil Veronal-Acetat-Puffer, pH 7,4 und 5 % Saccharose).

10. Dehydrierung

Die Dehydrierung wurde über die aufsteigende Alkoholreihe und Propylenoxid durchgeführt. Bei 4°C wurden die Proben

- a. 1 - 2 Minuten lang in 70%igem Alkohol
- b. 15 Minuten lang in 96%igem Alkohol
- c. 15 Minuten lang in absolutem Alkohol dehydriert.

Bei Zimmertemperatur wurden die Proben

a. 2 x 30 Minuten in absolutem Alkohol mit Molekularsieb

b. 2 x 30 Minuten in Propylenoxid

c. 1 x 60 Minuten in 1 Teil Propylenoxid : 1 Teil Maraglas dehydriert.

11. Einbettung (129)

Über Nacht wurde das Zellsediment bei 10°C im Eisschrank in reinem Maraglas (Standardmischung) aufbewahrt. Dann wurden die Zellen mit Maraglas in Gelatinekapseln eingebettet und 48 - 72 Stunden lang bei 60°C im Brutschrank polymerisiert.

12. Schneiden

Zur lichtmikroskopischen Voruntersuchung wurden halbdünne Schnitte durch die ganze Dicke des Zentrifugates mit Glasmessern gelegt. Danach wurden an der lymphozytenreichsten Stelle Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von etwa 600 Angström mit einem LKB Ultratom unter Verwendung von Diamantmessern hergestellt und auf Trägernetze aufgezo-gen, die mit Formvar-Folie in Äthylendichlorid gelöst - befilmt waren.

13. Färbung (107, 139)

Die Färbung erfolgte mit 2%iger wäßriger Uranyl-Acetat-Lösung für 30 Minuten und mit Bleicitrat-Lösung für 10 Minuten. Das Material wurde in einem Elmiskop 1 A der

Firma Siemens bei einer Vergrößerung von 5000 - 30.000 untersucht. Für die Photographien wurden Photoplatten der Firma Ilford verwendet.

14. Zahl der Versuche und Auswertung

In jeweils 11 Versuchen wurden Lymphozyten von Normalpersonen mit ATCG und AKanIg-Pox, bzw. mit AHumIg-Pox inkubiert; in 11 Versuchen wurden CLL-Zellen mit ATCG und AKanIg-Pox, in 9 Versuchen mit AHumIg-Pox inkubiert; in 6 Kontrollversuchen wurden Lymphozyten von Normalpersonen und CLL-Patienten mit Kan-N und AKanIg-Pox, bzw. mit Kan-N-Pox inkubiert. Von jedem der insgesamt 48 Versuchsansätze wurden mindestens 200 Lymphozyten im elektronenmikroskopischen Dünnschnitt entsprechend einer positiven oder negativen Membranmarkierung von mehreren Personen ausgezählt. Jeweils 150 ATCG-markierte und 150 AHumIg-markierte Lymphozyten von Normalpersonen, sowie 150 ATCG-markierte Zellen eines Patienten mit einer T-Zell-CLL und 150 AHumIg-markierte Zellen von Patienten mit B-Zell-CLL wurden fortlaufend ohne Auswahl mit etwa 10.000facher Vergrößerung im Elektronenmikroskop photographiert. Die Mitochondrien, Zytosomen und die Ergastoplasmalamellen von mehr als 1 μ m Länge wurden in jedem dieser insgesamt 600 Zellprofile registriert und in der ATCG-positiven und AHumIg-positiven Gruppe von Normalpersonen und CLL-Patienten, sowie untereinander verglichen.

IV. Statistische Methoden

Unterschiede zwischen den Werten ATCG-positiver bzw. AHumIg-positiver Zellen der 5 Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des Rangfolgetests nach Wilcoxon (48) auf statistische Signifikanz geprüft (siehe Abb. 1). Ob sich ATCG-positive bzw. AHumIg-positive Zellen in ihrem durchschnittlichen Gehalt pro Einzelzelle an Mitochondrien, Zytosomen oder Ergastoplasmalamellen unterscheiden, wurde durch den T-Test für ungepaarte Werte (48) geprüft (siehe Abb. 2, 3, 4). Die Tests wurden an einem Kleincomputer Interdata M 70 ausgeführt.

C. ERGEBNISSE

I. Quantitative Werte

Die AHumIg-markierten Lymphozyten werden nachfolgend als B-Lymphozyten, ATCG-markierte Lymphozyten als T-Lymphozyten bezeichnet. Im folgenden wird diese Klassifizierung begründet.

1. Normalpersonen

In Tabelle 2 sind die an vier Normalpersonen in elf Versuchen mit AHumIg und ATCG gewonnenen Werte aufgeführt. Im Durchschnitt zeigten B-Lymphozyten weitaus häufiger eine intrazelluläre Markierung, während Markierungen, die mehr als ein Achtel des Zellumfanges umfaßten, selten waren. Bei T-Lymphozyten waren hingegen auch ausgedehntere Membranmarkierungen die Regel, während intrazelluläre Markierungen nicht vorkamen. Der Mittelwert von B-Lymphozyten betrug 24,1 %, der von T-Lymphozyten 79,5 % (siehe Abb. 1). Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Gesamtzahl lymphatischer Zellen; Monozyten und andere myeloische Zellen sind aufgrund ihrer endogenen Peroxidaseaktivität sicher von Lymphozyten zu unterscheiden und daher in dieser Gesamtzahl nicht enthalten. Blutplasmazellen zeigten keine Markierung mit AHumIg (73); ihr Anteil an der Gesamtlymphozytenzahl beträgt beim Gesunden weniger als 3 % (68). Durch die

fehlende Berücksichtigung dieser Zellgruppe kann die gesamte Anzahl AHumIg-markierter Lymphozyten nicht wesentlich von der tatsächlichen Zahl der B-Lymphozyten abweichen.

Tabelle 2

Quantitative Ergebnisse der AHumIg- und ATCG-Markierung von Lymphozyten bei Normalpersonen in Prozent

AHumIg-markierte Lymphozyten Konzentration: 4 mg/ml						ATCG-markierte Lymphozyten Konzentration: 2 mg/ml					
Person	neg	pos	<1/8	>1/8	intrazell-	Person	neg	pos	<1/8	>1/8	intrazell-
GW	74,5	25,5	3,0	0,5	22,0	GW	20,5	79,5	35,5	44,0	-
GW	81,0	19,0	5,5	4,5	9,0	GW	16,0	84,0	42,5	41,5	-
GW	82,5	17,5	1,0	-	16,5	GW	18,5	81,5	41,5	40,0	-
DS	77,0	23,0	5,0	4,0	14,0	DS	20,0	80,0	33,0	47,0	-
GJ	80,0	20,0	-	-	20,0	GJ	30,0	70,0	15,0	55,0	-
DH	77,5	22,5	2,0	6,5	14,0	GJ	16,0	84,0	17,5	66,5	-
DH	73,0	27,0	6,0	3,0	18,0	DH	26,0	74,0	38,5	35,5	-
DH	72,0	28,0	2,0	-	26,0	DH	28,0	72,0	35,0	37,0	-
DH	75,5	24,5	4,5	1,0	20,5	DH	21,5	78,5	28,5	50,0	-
DH	68,0	32,0	4,0	3,0	25,0	DH	13,5	86,5	39,0	47,5	-
DH	74,0	26,0	4,5	1,0	20,5	DH	16,0	84,0	31,5	52,5	-

2. CLL-Patienten

a. B-Zell-CLL

In Tabelle 3 sind die an 7 Patienten in 9 Versuchen mit AHumIg und in 11 Versuchen mit ATCG gewonnenen Werte wiedergegeben. Im Durchschnitt waren auch hier bei den

B-Lymphozyten die intrazellulären Markierungen mit AHumIg wesentlich häufiger, während ausgedehnte Membranmarkierungen eine Seltenheit darstellten. Insgesamt war die Intensität der AHumIg-Markierung pro Einzellymphozyt geringer als bei normalen B-Zellen. Die T-Lymphozyten wiesen wie bei den Normalpersonen keine intrazellulären Markierungen auf, aber auch ausgedehnte Membranmarkierungen waren nicht so häufig.

Tabelle 3

Quantitative Ergebnisse der AHumIg- und ATCG-Markierung von Lymphozyten bei Patienten mit B-Zell-CLL in Prozent

AHumIg-markierte Lymphozyten Konzentration: 4 mg/ml						ATCG-markierte Lymphozyten Konzentration: 2 mg/ml					
Per son	neg	pos	<1/8	>1/8	intra zell	Per son	neg	pos	<1/8	>1/8	intra zell
PB	38,5	61,5	7,5	0,5	53,3	PB	95,0	5,0	5,0	-	-
WR	24,0	76,0	9,5	3,0	63,5	WR	80,5	19,5	14,0	5,5	-
RS	62,5	37,5	1,0	-	36,5	RS	96,0	4,0	4,0	-	-
EK	20,5	79,5	2,5	0,5	76,5	EK	79,0	21,0	16,5	4,5	-
GW	42,5	57,5	0,5	0,5	56,5	GW	80,0	20,0	17,0	3,0	-
WM	41,5	58,5	3,5	-	55,0	WM	91,5	8,5	6,5	2,0	-
WM	48,5	51,5	1,5	-	50,0	GW	90,0	10,0	6,5	3,5	-
GW	15,0	85,0	3,0	1,0	81,0	GW	94,0	6,0	4,5	1,5	-
GW	22,0	78,0	6,0	2,0	70,0	GW	90,0	10,0	6,0	4,0	-
						GW	71,0	29,0	25,0	4,0	-
						GW	87,0	13,0	10,5	2,5	-

Im Durchschnitt waren 65 % der Lymphozyten aufgrund ihrer AHumIg-Markierung als B-Lymphozyten zu identifizieren, während 13,3 % eine ATCG-Markierung aufwiesen und somit der T-Zellreihe zuzuordnen waren. Die Werte unterschieden sich signifikant ($2\alpha < 0,01$) von denen bei Normalpersonen und Kontrollen (siehe Abb. 1).

b. T-Zell-CLL

Für den Patienten mit T-Zell-CLL ergaben sich bei ATCG-Markierung folgende Werte: Negativ waren 23,5 % der Zellen, insgesamt positiv 76,5 %, wobei Markierungen kleiner als ein Achtel des Zellumfanges 57,5 % ausmachten und solche größer als ein Achtel 19 %. Auch in diesem Fall waren also ausgedehntere Membranmarkierungen nicht so häufig wie bei Normalpersonen. Für AHumIg-markierte Lymphozyten fanden sich folgende Werte: Negativ waren 96,5 % der Zellen, positiv insgesamt 3,5 %, wovon 3 % intrazellulär vorlagen und 0,5 % weniger als ein Achtel des Zellumfanges ausmachten. Aufgrund dieser Werte, sowie der klinischen Daten und anderen Untersuchungen (135) konnte die Diagnose einer T-Zell-CLL gestellt werden.

3. Kontrollen

In Tabelle 4 sind die an drei Normalpersonen in 4 Versuchen, sowie die an 2 Patienten mit B-Zell-CLL in 2 Versuchen mit Kan-N ermittelten Werte wiedergegeben. Im allgemeinen war die Markierung der einzelnen Lymphozyten bei den Kontrollversuchen deutlich geringer als bei

AHumIg-Markierung, lag jedoch ebenfalls vorwiegend intrazellulär vor. Durchschnittlich waren 6,3 % der Lymphozyten markiert. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant ($2\alpha < 0,01$) von den 24,1 % AHumIg-markierter Lymphozyten bei Normalpersonen, sowie von den 65 % AHumIg-markierter Lymphozyten bei Patienten mit B-Zell-CLL (siehe Abb. 1).

Tabelle 4

Quantitative Ergebnisse der Kan-N-Markierung von Lymphozyten bei Normalpersonen und bei Patienten mit B-Zell-CLL in Prozent

Kan-N-markierte Lymphozyten Konzentration: 4 mg/ml					
Person	neg	pos	<1/8	>1/8	intrazell-
GJ	100,0	-	-	-	-
GJ	95,0	5,0	-	-	5,0
GW	91,0	9,0	1,5	0,5	7,0
DH	88,0	12,0	1,5	-	10,5
GW CLL	98,5	1,5	-	-	1,5
WR CLL	89,5	10,5	-	-	10,5

II. Morphologische Befunde

1. Verteilung der Zellorganellen in B- und

T-Lymphozyten bei Normalpersonen

B- und T-Lymphozyten unterscheiden sich nicht in ihrem durchschnittlichen Gehalt an Mitochondrien (siehe Abb. 2). Hingegen ist der Mittelwert der Zytosomen pro Einzelzelle in der Gruppe der T-Lymphozyten signifikant größer ($2\alpha < 0,05$) als bei den B-Lymphozyten; Ergastoplasmalamellen sind signifikant häufiger ($2\alpha < 0,005$) bei den B-Lymphozyten (siehe Abb. 5, 6). Dennoch lassen sich die einzelnen Lymphozyten aufgrund ihres Organellenreichtums nicht der B- oder T-Zellgruppe zuordnen: Die Variationsbreite der morphologischen Werte ist in den einzelnen Zellen sehr groß, wie in den hohen Standardabweichungen der Abbildung 2 zum Ausdruck kommt.

2. Verteilung der Zellorganellen in B- und T-Lymphozyten bei Patienten mit B- und T-Zell-CLL

Die B-Lymphozyten der B-Zell-CLL unterscheiden sich von den T-Lymphozyten der T-Zell-CLL signifikant in ihrem durchschnittlichen Gehalt an Mitochondrien ($p < 0,05$), Zytosomen sowie Ergastoplasmalamellen ($p < 0,001$) pro Einzelzelle. Dieser ist für die drei ausgewerteten Zellorganellen jeweils bei der B-Zell-CLL größer (siehe Abb. 3, 7, 8, 9, 10). Auch hier lassen sich die einzelnen Lymphozyten allein aufgrund ihres Organellenreichtums nicht

der B- oder T-Zellreihe zuordnen. Die hohen Standardabweichungen der Abbildung 3 zeigen, daß die Variationsbreite der morphologischen Werte in den einzelnen Zellen dafür zu groß ist. Bei den T-Lymphozyten der T-Zell-CLL wiesen 3 % der Zellen einen gyrierten Kern auf, wie er bei Sézary-Zellen gefunden wird (siehe Abb. 10).

3. Vergleich der Verteilung von Zellorganellen in B- und T-Lymphozyten bei Normalpersonen mit der von B- und T-Lymphozyten bei Patienten mit entsprechender CLL

Der durchschnittliche Gehalt der B-Lymphozyten bei B-Zell-CLL an Mitochondrien ($p < 0,01$), Zytosomen und Ergastoplasmalamellen ($p < 0,001$) ist signifikant größer als der bei B-Lymphozyten von Normalpersonen pro Einzelzelle (siehe Abb. 4). Bei den T-Lymphozyten der T-Zell-CLL konnte lediglich ein signifikant ($p < 0,001$) geringerer Mittelwert an Ergastoplasmalamellen pro Einzelzelle gegenüber den T-Lymphozyten von Normalpersonen ermittelt werden. In ihrem mittleren Gehalt an Mitochondrien und Zytosomen unterscheiden sich die T-Lymphozyten bei T-Zell-CLL nicht signifikant von normalen T-Lymphozyten (siehe Abb. 4). Auch hier ist die Variationsbreite der morphologischen Werte in der einzelnen Zelle sehr groß, wie an den hohen Standardabweichungen der Abbildung 4 zu sehen ist. Daher ist es auch in diesem Vergleich nicht möglich, die einzelnen Lymphozyten aufgrund ihres Organellenreichtums zu unterscheiden.

III. Abbildungen



Abb. 1: Mittelwert und Standardabweichung nach Markierung mit AHumIg, mit ATCG sowie mit Kan-N bei Normalpersonen und bei CLL-Patienten. Statistisch signifikant ($2\alpha < 0,01$) unterscheiden sich die Versuchsgruppen 1 und 2, 1 und 3, 1 und 4, 1 und 5, 2 und 3, 2 und 4, 2 und 5, 3 und 4, 3 und 5.

Abb. 2 - 4: Mittelwert und Standardabweichung von Mitochondrien, Zytosomen und Ergastoplasmalamellen pro Lymphozyt von jeweils 150 untersuchten Zellen.

Abb. 2: Bei Normalpersonen unterscheiden sich die beiden Lymphozytengruppen signifikant ($2\alpha < 0,005$) in ihrem mittleren Gehalt an Zytosomen und Ergastoplasmalamellen.

Abb. 3: Bei Patienten mit B-Zell-CLL und T-Zell-CLL unterscheiden sich die beiden Lymphozytengruppen signifikant ($p < 0,001$) in ihrem mittleren Gehalt an Mitochondrien, Zytosomen und Ergastoplasmalamellen.

Abb. 4: Vergleichende Darstellung von Abb. 2 und Abb. 3. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) besteht in dem mittleren Gehalt an Mitochondrien, Zytosomen und Ergastoplasmalamellen zwischen AHumIg-positiven Lymphozyten bei Normalpersonen und bei Patienten mit B-Zell-CLL. Die ATCG-positiven Zellen von Normalpersonen unterscheiden sich von denen des Patienten mit T-Zell-CLL lediglich in ihrem mittleren Gehalt an Ergastoplasmalamellen signifikant ($p < 0,001$).

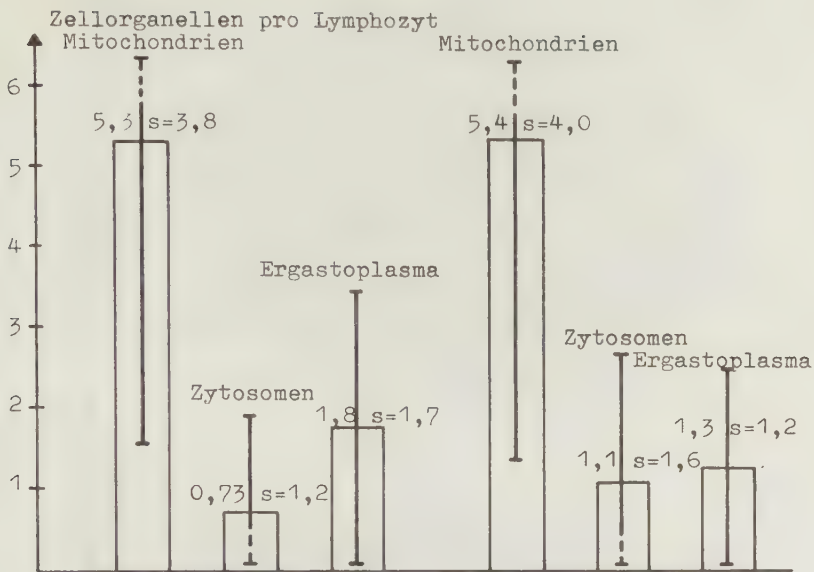


Abb. 2: AHumIg-pos. Lymphozyten
Normalpersonen (n=150)

ATCG-pos. Lymphozyten
Normalpersonen (n=150)

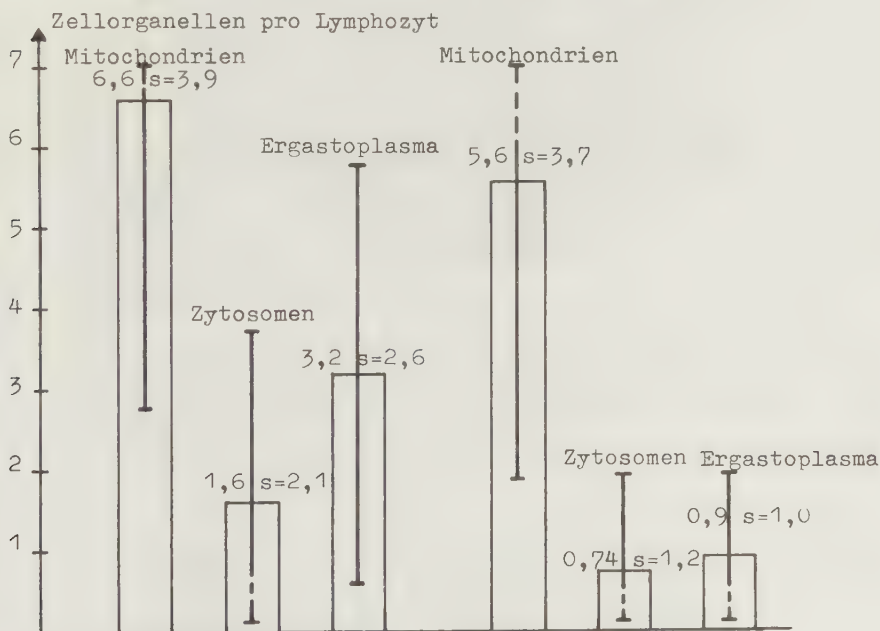
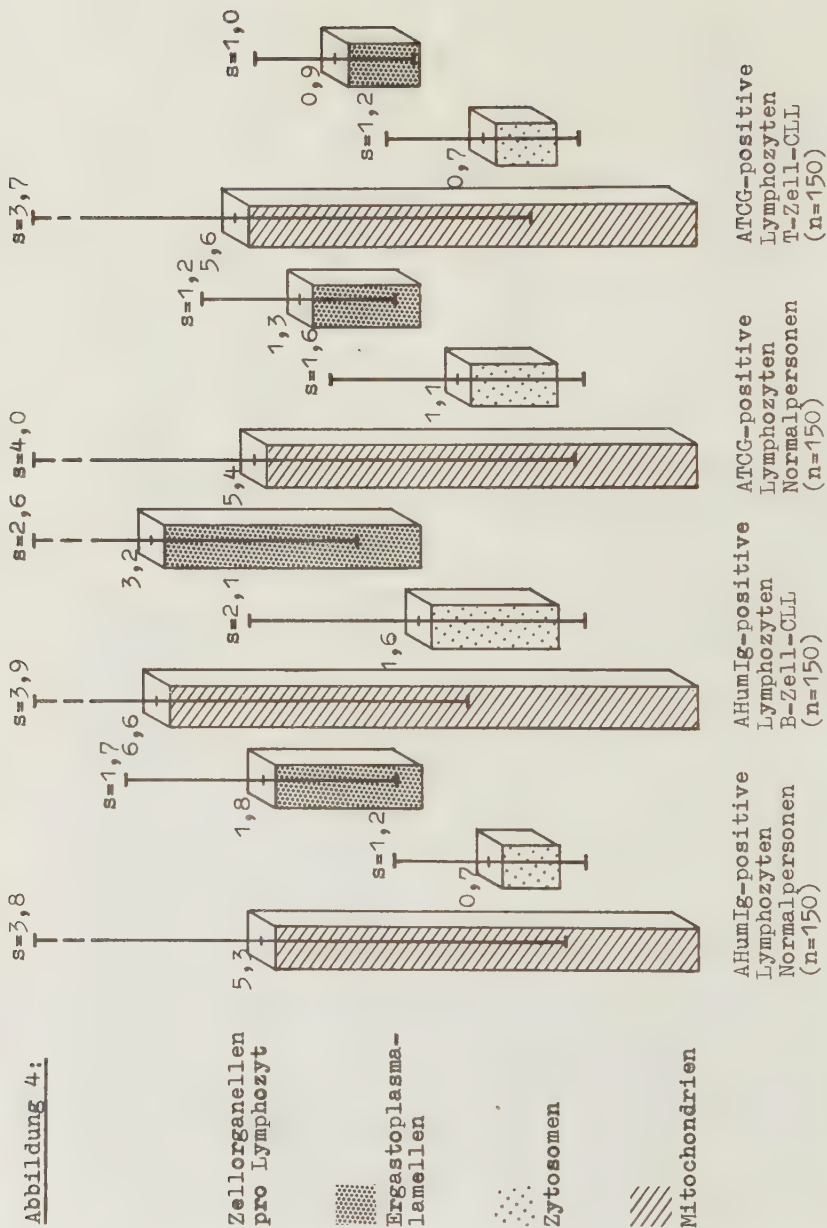


Abb. 3: AHumIg-pos. Lymphozyten
B-Zell-CLL (n=150)

ATCG-pos. Lymphozyten
T-Zell-CLL (n=150)

Abbildung 4:



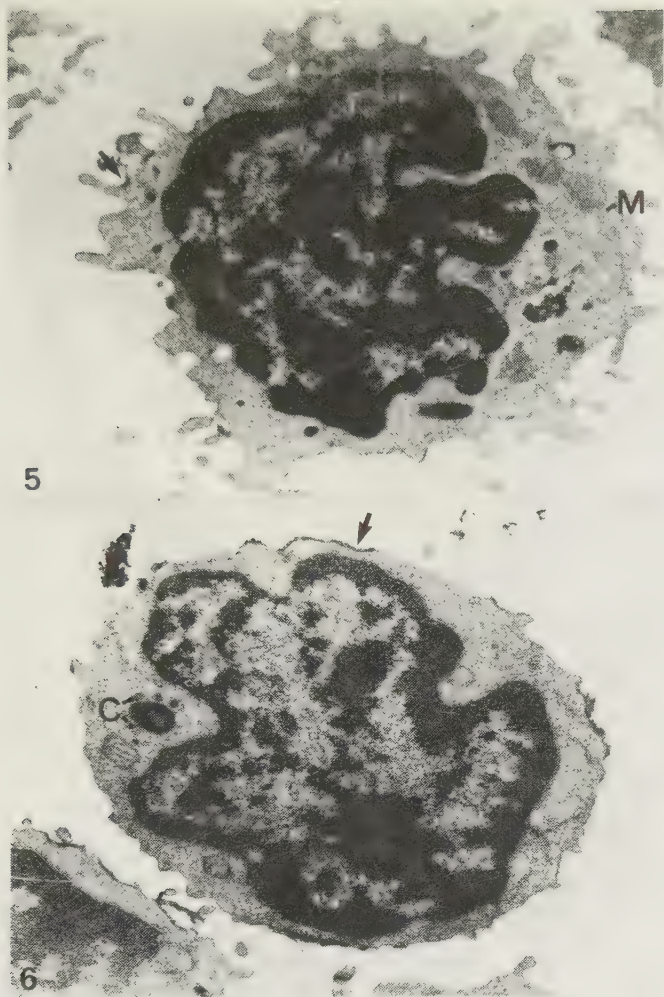
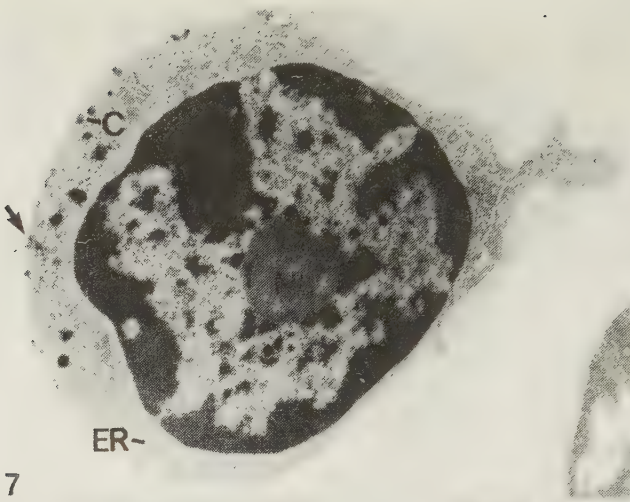
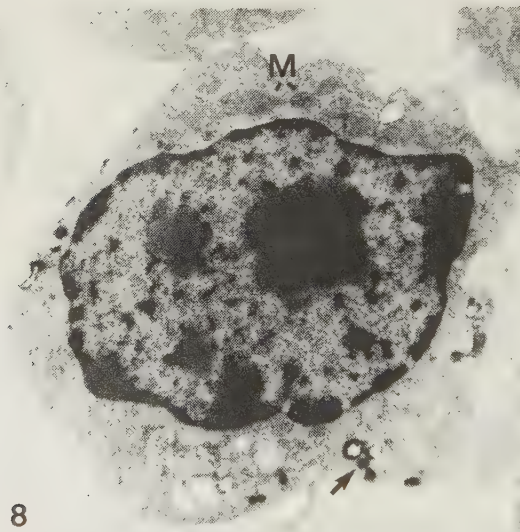


Abb. 5: Normalperson, AHuIg-positiver Lymphozyt. Gebuchteter Kern mit großem Nucleolus. Im Zytoplasma einige Mitochondrien (M), einzelne Pox-positive Zytosomen (C) sowie Ergastoplasmalamellen. Membranmarkierung fleckig, teilweise Endocytose (Pfeil). Vergrößerung x 16.000.

Abb. 6: Normalperson, ATCG-positiver Lymphozyt. Im Kern kein Nucleolus. Im Zytoplasma wenige Mitochondrien und Ergastoplasmalamellen sowie eine Gruppe von Zytosomen (C). Ausgedehnte Membranmarkierung ohne Endocytose. Vergrößerung x 19.000.



7



8

Abb. 7: B-Zell-CLL, AHumIg-positiver Lymphozyt. Im Heterochromatin des Kerns großer Nucleolus (NL). Im Zytoplasma wenige Mitochondrien, mehrere Zytosomen (C) und zahlreiche lange Ergastoplasmalamellen (ER). Die Membranmarkierung ist schwach (Pfeil). Vergrößerung x 16.000.

Abb. 8: B-Zell-CLL, AHumIg-positiver Lymphozyt. Kleiner Nucleolus. Im Zytoplasma zahlreiche große Mitochondrien (M) und lange Ergastoplasmalamellen. Die Membranmarkierung ist schwach und teilweise in Form kleiner Tubuli und Vesikel in die Zelle verlagert (Pfeil). Vergrößerung x 16.000.

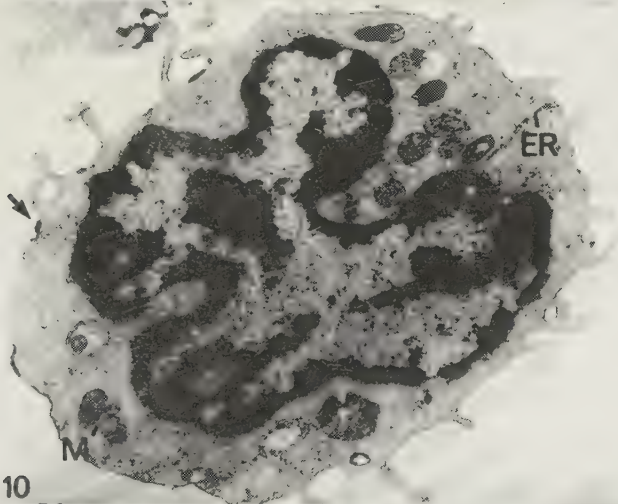
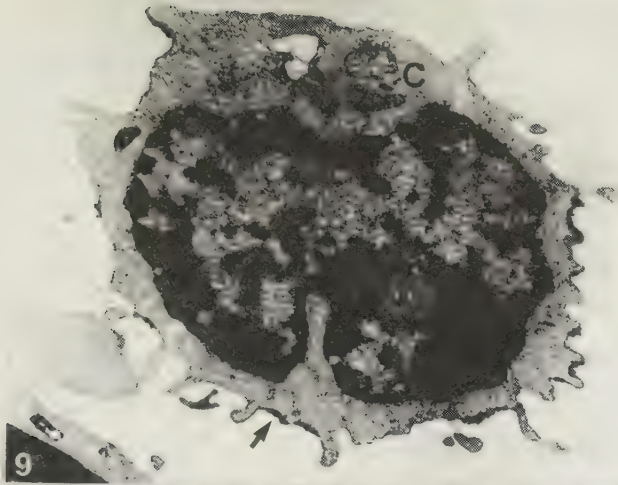


Abb. 9: T-Zell-CLL, ATCG-positiver Lymphozyt. Im Kern großer Nucleolus (NL). Im Zytoplasma wenige Zellorganellen: einige Mitochondrien und Zytosomen (C). nur stellenweise Pox-Markierung der Membran (Pfeil). Vergrößerung x 19.000.

Abb. 10: T-Zell-CLL, ATCG-positiver Lymphozyt. Stark gyrierter Kern mit zwei Nucleolen. Im Zytoplasma zahlreiche Mitochondrien (M), einige Zytosomen und Ergastoplasmalamellen (ER). Schwache Membranmarkierung (Pfeil). Vergrößerung x 17.000.

D. DISKUSSION

I. Quantitative Werte

Unsere Untersuchungen ergaben durchschnittlich 24,1 % AHumIg-markierte Lymphozyten und 79,5 % ATCG-markierte Lymphozyten. Diese B-T-Zellrelation stimmt gut überein mit den Ergebnissen anderer Untersucher, die mit ähnlichen oder anderen Methoden arbeiteten (3, 5, 8, 14, 17, 20, 28, 35, 44, 67, 102, 106, 121, 138, 141). Diese Übereinstimmung der Werte bei Anwendung von verschiedenen Methoden deutet darauf hin, daß eine zutreffende B-T-Zellrelation mit jeder dieser Methoden erreicht werden kann.

Von mehreren Autoren (28, 33, 60, 80, 89, 94) werden in ihren Untersuchungen bei simultaner Doppelmarkierung Lymphozyten mit fehlenden Markereigenschaften, sog.

"Null"-Zellen beschrieben, die mit den herkömmlichen Methoden nicht zu markieren sind. In weiteren Versuchen mit diesen "Null"-Zellen konnte jedoch nachgewiesen werden, daß diese Zellen in der Lage sind, Immunglobuline zu sezernieren (33). Ob es sich um unreife Zellformen aus der B-Population handelt, die ihre spezifischen Membraneigenschaften noch nicht erlangt haben, oder eventuell auch um unreife T-Lymphozyten handelt, ist noch nicht endgültig geklärt. Wir konnten in unseren Untersuchungen an Normalpersonen die Existenz von "Null"-Zellen nicht nachweisen. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf eine eindeutige Zuordnungs-

möglichkeit zur B- oder T-Zellreihe hin.

Mehrfach wurde in letzter Zeit eine Lymphozytengruppe mit gemischten B- und T-Zell-Eigenschaften beschrieben. Dabei wurden auf T-Lymphozyten der Fc-Rezeptor (15, 46, 142), sowie in geringen Mengen Membranimmunglobuline (149) gefunden. Auch unsere Untersuchungen deuten auf die Existenz einer kleinen Zellpopulation hin, die sich mit AHumIg und ATCG markieren läßt, da sich die Prozentzahlen auf über 100 % summieren. Über die Bedeutung dieser Lymphozytengruppe wird noch diskutiert (109, 115, 150), eine endgültige Klärung bedarf noch weiterer Untersuchungen. Wesentlich gehäuft traten bei B-Zellen intrazelluläre Markierungen auf. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Untersucher (9, 17, 141), die eine gleichmäßige Markierung der Zellmembran, die meist ein Viertel bis die Hälfte des Zellumfanges umfaßte, beobachteten. Diese Unterschiede sind möglicherweise damit zu erklären, daß sich die Untersucher vorwiegend fluoreszenzoptischer Methoden bedienten, deren Darstellung der Lymphozyten sich wesentlich vom genaueren elektronenoptischen Bild unterscheidet. Weiterhin werden aufgrund unserer Präparationsmethode (keine Vorfixierung; Inkubationsdauer einschließlich der Waschvorgänge etwa 40 Minuten bei 4°C) die Peroxidase-markierten Immunglobuline weitgehend von den Zellen aufgenommen (siehe Abb. 5).

Der Einfluß der Temperatur bei Markierung und Auswaschen

auf die Konzentration der Membranimmungoglobuline bei B-Lymphozyten wird nicht einheitlich beurteilt. Lobo und Mitarbeitern (84) gelang es, durch Waschen bei 37°C von über der Hälfte der zuvor positiven Lymphozyten die Globuline zu entfernen. Dies deutet darauf hin, daß nur ein Teil der B-Lymphozyten tatsächlich in die Membran inkorporierte Globuline besitzt. Unanue und Mitarbeiter (138) beobachteten, daß bei Inkubations- und Auswaschtemperaturen, die über 4°C lagen, die Inkorporation von Membranimmungoglobulinen verstärkt war. Weiterhin wurde festgestellt, daß durch eine Vorfixierung mit Glutaraldehyd der Prozentsatz positiver B-Lymphozyten gesteigert werden kann (106).

Obwohl eine einheitliche Beurteilung dieser unterschiedlichen Befunde zur Zeit noch nicht möglich scheint, muß bei der Wahl der Präparationsmethode darauf geachtet werden, daß die Temperatur bei Markierung und Auswaschen, sowie eine Vorfixierung Veränderungen sowohl in der Anzahl positiver B-Lymphozyten als auch in der Art der Markierung bewirken, die die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschweren können.

Bei T-Zellen konnte keine Inkorporation von Markern festgestellt werden, vielmehr war eine einheitliche Membranmarkierung zu erkennen (siehe Abb. 6). Gleiche Befunde konnten bei Versuchen mit Mäusen erhoben werden (71, 72). Dies deutet auf die grundsätzlich verschiedenen Membranantigene und deren unterschiedliche Funktion bei B-

und T-Lymphozyten hin. Diese Tatsache erleichtert jedoch eine Unterscheidung von AHumIg- und ATCG-markierten Zellen im elektronenmikroskopischen Bild.

Bei der B-Zell-CLL stimmen die gefundenen Werte von 65 % AHumIg- und 13,3 % ATCG-markierten Lymphozyten ebenfalls gut mit den Werten anderer Untersucher überein (26, 33, 38, 54, 80, 100, 117). Dabei ist jedoch kritisch zu beachten, daß der Prozentsatz markierbarer Lymphozyten bei B-Zell-CLL im Verlauf weniger Wochen stark variieren kann, wie Davis (42) nachwies.

Von mehreren Autoren (4, 43, 80, 85, 90) werden in ihren Untersuchungen von B-CLL-Zellen bei simultaner Doppelmarkierung ebenfalls Lymphozyten mit fehlenden Markereigenschaften, sog. "Null"-Zellen beschrieben. Derartige CLL-Zellen waren wie die normalen Lymphozyten, denen die Markereigenschaften fehlten, in der Lage nach drei Tagen Immunglobuline zu sezernieren. Auch unsere Untersuchungen scheinen auf die Existenz von "Null"-Zellen hinzuweisen, da nur insgesamt 78,3 % der Lymphozyten mit AHumIg und ATCG zu markieren waren, während die restlichen Lymphozyten keine Markierung zeigten. Es könnte sich bei diesen "Null"-Zellen entweder um unreife Zellformen handeln, die ihre spezifischen Membraneigenschaften noch nicht erlangt haben oder um neoplastisch entartete B-Lymphozyten mit Membranimmunglobulinkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze durch die hier angewandte Methode. Es be-

stünde auch die Möglichkeit, daß ein Teil der B-Lymphozyten bei der B-Zell-CLL auf einer Stufe ihrer Entwicklung neoplastisch entartet, die eine spätere Immunglobulinproduktion nicht mehr zuläßt. Diese Fragen müssen durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Einige Untersucher wiesen bei der B-Zell-CLL eine Lymphozytengruppe mit gemischten B- und T-Zell-Eigenschaften nach, deren Bedeutung und Funktion noch nicht geklärt ist (118, 126). Unsere Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf die Existenz solcher Lymphozyten mit beiden Markern bei der B-Zell-CLL. Die markierten Lymphozyten lassen sich vielmehr eindeutig der B- oder T-Zellreihe zuordnen.

Bei den B-Zellen der B-Zell-CLL fanden wir noch wesentlich häufiger als bei normalen B-Lymphozyten intrazelluläre Markierungen. Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit denen anderer Untersucher, die ebenfalls, allerdings fluoreszenzoptisch, fleckige und intrazelluläre Membrankierungen beschrieben (85, 90). Außerdem war die Intensität der Markierung mit AHuIg bei den Zellen der B-CLL geringer als bei normalen Lymphozyten. Gleichartige Befunde erhoben auch Mc Laughlin (85), Nath (90) und Aiuti (7). Die geringere Intensität der Markierung ist wohl auf die geringere Dichte der Immunglobulinmoleküle bei diesen Lymphozyten zurückzuführen. Dies deutet auf eine gestörte Funktion der Zellen durch die neoplastische Entartung hin. Ein weiterer Hinweis auf eine Funktions-

störung ist das fehlende "capping", das weder von uns noch von anderen Untersuchern bei der CLL gefunden wurde (34, 85, 90).

Bei der T-Zell-CLL ergaben unsere Untersuchungen 76,5 % ATCG-markierte Zellen und 3,5 % AHuIg-positive Lymphozyten. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen der wenigen bisher untersuchten Fälle von T-Zell-CLL überein (26, 75, 83, 134).

Auch in diesem Fall ergibt sich ein Hinweis auf "Null"-Zellen, da 20 % der Lymphozyten mit den herkömmlichen Methoden nicht zu markieren waren. Da dieses Ergebnis auch bei der B-Zell-CLL vorlag und in unseren Untersuchungen die Prozentzahlen der nicht markierten Zellen nahezu identisch sind (21,7 % bei der B-Zell-CLL : 20 % bei der T-Zell-CLL), muß die Frage gestellt werden, ob die Zellen beider CLL-Formen möglicherweise auf der gleichen Entwicklungsstufe maligne entarten. Dies könnte von einer gemeinsamen, noch undifferenzierten Vorläufer-Zelle oder von für beide CLL-Formen spezifischen Vorläufer-Zellen aus geschehen. Eine weitere Erklärung für die Existenz von "Null"-Zellen wäre auch bei der T-Zell-CLL darin zu sehen, daß einige Lymphozyten ihre spezifischen Membraneigenschaften nicht besitzen oder noch nicht ausgebildet haben.

In dem Fall von T-Zell-CLL waren ausgedehnte Membranmarkierungen nicht so häufig und schwächer als bei normalen

T-Lymphozyten. Offensichtlich besitzen auch die Zellen der T-Zell-CLL schwächer ausgebildete, immunologisch nicht so potente Membranantigene, was ebenfalls ein Hinweis für eine durch die maligne Entartung bedingte Funktionsstörung dieser Lymphozyten wäre.

II. Morphologische Befunde

Die quantitative Auswertung der Zellorganellen von je 150 B- und T-Lymphozyten von Normalpersonen zeigt, daß die B-Lymphozyten signifikant mehr Ergastoplasma als T-Lymphozyten, die T-Lymphozyten signifikant mehr Zytosomen als die B-Lymphozyten pro Einzelzelle enthalten. Die an den hohen Standardabweichungen abzulesende Schwankungsbreite der Zellorganellen (siehe Abb. 2) läßt jedoch erkennen, daß eine Differenzierung allein anhand dieser morphologischen Unterschiede nicht möglich ist. In jedem Fall müssen also die spezifischen Membraneigenschaften der Lymphozyten zur Differenzierung herangezogen werden.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse läßt sich schließen, daß den Ergastoplasmalamellen bei den B-Lymphozyten und den Zytosomen bei den T-Lymphozyten eine gewisse Bedeutung hinsichtlich der immunologischen Funktion zukommt.

Das Ergastoplasma (ribosomenhaltiges endoplasmatisches Retikulum: "rough surfaced endoplasmic reticulum") dient im Lymphozyten der Bildung der als Antikörper wirkenden

Globuline. Es wurde bisher noch wenig untersucht (68). Der höhere Gehalt an Ergastoplasmalamellen mit 1,8 pro B-Lymphozyt gegenüber 1,2 pro T-Lymphozyt ist durch die unterschiedliche Funktion der Lymphozytenpopulationen bei der Immunantwort zu erklären. Man kann aus der Relation von B- zu T-Lymphozyten-Ergastoplasma auf die bereits fortgeschrittene Differenzierung des B-Lymphozyten zur Plasmazelle schließen. Eine größere Anzahl von Ergastoplasmalamellen ist daher mit der B-Zelleigenschaft der Lymphozyten korreliert.

Die signifikant höhere Zahl von Zytosomen in T-Lymphozyten mit 1,1 pro Zelle gegenüber 0,73 pro Zelle im B-Lymphozyten läßt sich ebenfalls auf die unterschiedliche Funktion der beiden Lymphozytengruppen bei der Immunantwort zurückführen. Verschiedene Untersucher (22, 32, 51) wiesen nach, daß es sich bei den Zytosomen um sog. Zyto-lysosomen handelt, die reich an lysosomalen Enzymen, vor allen Dingen an saurer Phosphatase sind. Diese Enzyme unterstützen die Funktion der T-Lymphozyten als "killer-cells" bei der zellulären Immunantwort, und eine höhere Anzahl derartiger lysosomaler Enzyme enthaltender Zytosomen im T-Lymphozyten ist damit zu deuten. Außerdem läßt die vorhandene Zytosomenzahl auf den Differenzierungsgrad der Zelle schließen. Eine größere Anzahl von Zytosomen ist also mit der T-Zelleigenschaft der Lymphozyten korreliert.

Den Mitochondrien kommt offenbar bei der Erfüllung der

spezifischen Aufgaben der Lymphozyten in der Immunabwehr keine besondere Bedeutung zu, da kein signifikanter Unterschied in dem Gehalt an Mitochondrien pro Einzelzelle zwischen B- und T-Lymphozyten bestand.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen gut mit denen von Cohnen (38) überein, der bei den B- und T-Lymphozyten von Normalpersonen 4,92 Mitochondrien und 1,52 Lysosomen pro Zelle fand. Douglas und Mitarbeiter (51) ermittelten einen Wert von 1,07 Lysosomen pro Zelle. Wir möchten jedoch nicht ausschließen, daß die von uns ermittelten Werte für Zytosomen auch solche beinhalten, die sich durch ihren Gehalt an Malat-Dehydrogenase, einer unspezifischen Esterase, auszeichneten. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Douglas und Mitarbeitern (51) gestützt, die in vitro auch eine hohe Aktivität der Malat-Dehydrogenase bei Lymphozyten fanden.

Mögliche Fehler bei unserer Untersuchung könnten in der eventuell unterschiedlichen Schnittfläche der Zellen liegen, wobei vorhandene Zellorganellen entweder mehrmals oder gar nicht getroffen wurden. Diese Fehlerquelle wurde durch das alleinige Auswerten von Zellen, bei denen die Schnittfläche in der Mitte der Zellebene lag, weitgehend ausgeschlossen. Eine weitere Fehlerquelle wäre die falsche Beurteilung oder ungenaue Auszählung von Zellorganellen. Wir schlossen in unseren Untersuchungen diese Fehlermöglichkeit durch Anfertigen von Photographien der zu

untersuchenden Zellen und mehrmaliges Auswerten der Zellprofile von verschiedenen Untersuchern aus.

Die quantitative Auswertung der Zellorganellen von je 150 B- und T-Lymphozyten bei der jeweiligen CLL-Form belegt, daß die Lymphozyten der B-Zell-CLL signifikant mehr Mitochondrien, Ergastoplasmalamellen und Zytosomen enthalten als die Lymphozyten der T-Zell-CLL. Aber auch hier läßt die durch die hohen Standardabweichungen dargestellte Schwankungsbreite der Werte (siehe Abb. 3) eine morphologische Differenzierung der beiden CLL-Typen nicht zu. Auch hier muß zur sicheren Unterscheidung auf die Darstellung mit Membranmarkern verwiesen werden. Die ermittelten Werte geben aber Aufschluß über einige morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen den beiden CLL-Formen.

Bei den Fällen von B-Zell-CLL, die wir untersuchten, ist eine Differentialdiagnose zum Immunozytom, das von Stacher und Mitarbeitern (130), die der Kieler Lymphomgruppe angehören, beschrieben wurde, zu treffen. Die Tabelle 1 zeigt, daß bei unseren Patienten mit CLL Milzvergrößerung und Knochenmarkbefall häufig auftraten. Die absolute Zahl der Leukozyten lag in allen Fällen über $20.000/\text{mm}^3$. Das Differentialblutbild ergab in allen Fällen Lymphozytenzahlen über 90 % der Gesamtzahl weißer Blutkörperchen in Prozent. Die beiden Ergebnisse zusammen lassen auf eine erhebliche Zunahme der absoluten

Lymphozytenzahlen im Blut schließen. Einzelne Globulinfraktionen waren in der Regel vermindert, es lag keine Paraproteinämie vor. Die Ergebnisse von Stacher und Mitarbeitern bei der Untersuchung von Immunozytomen weist aus, daß Milzvergrößerung und Knochenmarkbefall bei dieser Krankheit wesentlich weniger häufig als bei der CLL sind. Die absolute Lymphozytenzahl liegt meist unter $20.000/\text{mm}^3$. Häufig liegen auch Paraproteinämien vor. Diese wesentlichen Unterschiede zwischen den klinischen Daten unserer Patienten und den Patienten mit Immunozytom bei Stacher und Mitarbeitern erlauben den Schluß, daß es sich bei unseren Patienten um klinisch verifizierbare Fälle von CLL handelt.

Bei dem beschriebenen Fall von T-Zell-CLL ist eine Differentialdiagnose zum Sézary-Syndrom zu treffen. Bei unserem Patienten bestand bereits vor Auftreten der CLL eine Erythrodermie (siehe Tabelle 1). 3 % der untersuchten Lymphozyten wiesen die Merkmale von Sézary-Zellen auf (siehe Abb. 10). Die anderen klinischen Befunde lassen die Diagnose einer CLL zu. Beim Sézary-Syndrom ist vor allen Dingen der Prozentsatz sog. Sézary-Zellen im Blut, sowie eine generalisierte Erythrodermie, Hautinfiltrate und Lymphknotenbefall für die Diagnose ausschlaggebend (47, 52, 56, 147). Der Prozentsatz der Sézary-Zellen im Blut beträgt meist über 50 % der Gesamtzahl der Lymphozyten. Wegen dieser Unterschiede der Befunde bei unserem Patienten und bei einem Sézary-Syndrom muß die Diagnose in unserem Fall T-Zell-CLL heißen.

Die signifikante Erhöhung von Mitochondrien, Zytosomen und Ergastoplasmalamellen bei der B-Zell-CLL gegenüber der T-Zell-CLL legt den Schluß einer wesentlich erhöhten Zellaktivität der Zellen bei der B-Zell-CLL nahe. Die höhere Zahl der Mitochondrien weist mit Sicherheit auf eine vermehrte Zellaktivität der Zellen bei der B-Zell-CLL hin. Die bedeutend höheren Werte von $3,2 : 1,0$ Ergastoplasmalamellen pro Zelle zwischen den beiden CLL-Formen deuten eine vermehrte Immunglobulin-Produktion der B-Lymphozyten an. Dies muß aber nicht heißen, daß diese Immunglobuline sezerniert werden, da bei unseren Patienten häufig einzelne oder alle Globulinfraktionen im Blut vermindert waren. Vielmehr deuten die Ergebnisse eine auf die neoplastische Entartung zurückzuführende Funktionsstörung bei der Produktion oder Sekretion von Immunglobulinen an, die die Zellen reaktiv mit einer Vermehrung der Ergastoplasmalamellen beantworten. Bei der T-Zell-CLL ist eine derart extreme Vermehrung nicht notwendig, da das Ergastoplasma bei der Ausübung der immunologischen Funktion der T-Lymphozyten nicht so eine wichtige Funktion erfüllt. Die signifikant höhere Zahl von Zytosomen bei der B-Zell-CLL läßt sich nur schwer interpretieren. Wir glauben nicht, daß es sich dabei um einen besonderen Hinweis auf erhöhte Zellaktivität handelt, vielmehr könnte dies auf gestörte Teilungsaktivitäten und eine durch die andere neoplastische Art der Erkrankung verursachte Erhöhung bei der B-Zell-CLL hindeuten. In jedem Fall sind die

B-Zelleigenschaften einer CLL mit der höheren Anzahl von Zellorganellen korreliert.

Als Fehlerquellen sind die gleichen wie bei Untersuchungen an Normalpersonen zu beachten.

Die vergleichende quantitative Auswertung der Zellorganellen von je 150 B-Lymphozyten bei Normalpersonen und bei Patienten mit B-Zell-CLL zeigt, daß der mittlere Gehalt an Mitochondrien, Zytosomen und Ergastoplasmalamellen pro Einzelzelle bei den Lymphozyten der B-Zell-CLL signifikant höher ist als bei B-Lymphozyten von Normalpersonen. Die vergleichende quantitative Auswertung der Zellorganellen von je 150 T-Lymphozyten bei Normalpersonen und bei T-Zell-CLL ergibt, daß die Zellen der T-Zell-CLL lediglich eine signifikant geringere Anzahl von Ergastoplasmalamellen aufweisen, sich aber sonst von T-Lymphozyten bei Normalpersonen nicht signifikant unterscheiden. In beiden Fällen ist jedoch die Variationsbreite der Werte in den einzelnen Zellen zu groß, wie die hohen Standardabweichungen der Abbildung 4 ausweisen, so daß auch hier eine Differenzierung allein anhand der Morphologie nicht in Frage kommt. In jedem Fall sind die Membranmarker zur sicheren Darstellung der Lymphozytenpopulationen notwendig. Die Untersuchungen belegen aber einige morphologische und funktionelle Unterschiede der verschiedenen, untersuchten Zellpopulationen.

Die Erhöhung der Mitochondrienzahl bei der B-Zell-CLL ist sicher auf eine erhöhte Zellaktivität dieser Zellen zurück-

zuführen. Ähnliche Ergebnisse fand Cohnen (38), der eine Erhöhung der Mitochondrienzahl pro Zelle von 4,92 bei Normalpersonen auf 5,41 bei CLL-Zellen beschreibt. Die signifikante Erhöhung der Zytosomenzahl von 0,73 auf 1,6 pro Einzelzelle bei der B-Zell-CLL läßt sich dahingehend deuten, daß eine Zunahme von Malat-Dehydrogenase enthaltenden Zytosomen vorliegt. Andere Untersucher (23, 24, 82) fanden, daß die Zahl der saure Phosphatase enthaltenden Lysosomen bei der CLL signifikant abnimmt, während die Aktivität von Malat-Dehydrogenase im Lymphozyten zunimmt (51). Da die Werte dieser Untersucher bei Normalpersonen gut mit den von uns ermittelten übereinstimmen, dürfte wohl eine Erhöhung Malat-Dehydrogenase sezernierender Zytosomen bei Berücksichtigung aller Befunde vorliegen. Diese Tatsache würde unseren Schluß unterstützen, wonach die Lymphozyten der B-Zell-CLL trotz erheblicher Zellaktivitäten in der Ausübung ihrer immunologischen Funktion gestört sind. Die Erhöhung der Ergastoplasmalamellen bei der B-Zell-CLL legt den Schluß nahe, daß diese Ergastoplasmalamellen zur Immunglobulin-Sekretion befähigt sind, und somit nach der Kieler Klassifikation keine B-Zell-CLL, sondern ein Immunozytom vorläge (133). Da jedoch keine Erhöhung der Immunglobuline im Blut gefunden wurde, schließen wir daraus auf eine reaktive, durch die neoplastische Entartung der Zellen bedingte Vermehrung von Ergastoplasmalamellen, die nicht zur Bildung oder Sekretion von Immunglobulinen befähigt

sind. Das vorhandene Ergastoplasma könnte dabei auf die fortgeschrittene Differenzierung zur nicht funktionsfähigen Plasmazelle hinweisen, was auch die geringere Dichte der Immunglobulinmoleküle bei der Markierung erklären könnte. Abschließend betrachtet ist eine erhöhte Zahl von Zellorganellen im B-Lymphozyten mit dem Vorkommen einer CLL korreliert.

Die signifikante Erniedrigung der Ergastoplasmalamellen bei der T-Zell-CLL deutet auf Abnahme der Zellaktivität dieser Zellen hin. Dies könnte aufgrund der malignen Entartung geschehen, die eine reaktive Verminderung der Ergastoplasmalamellen zur Folge hat, welche der T-Lymphozyt nicht wesentlich zur Erfüllung seiner immunologischen Funktion benötigt. Die Abnahme der Zytosomen pro Zelle bei der T-Zell-CLL würde aber eher auf eine allgemein verringerte Zellaktivität schließen lassen. Daraus könnte ein Hinweis auf eine andere Richtung der neoplastischen Entartung abgeleitet werden, weil die Lymphozyten der T-Zell-CLL nicht mit einer reaktiven Zunahme ihrer Zellaktivität wie die Lymphozyten der B-Zell-CLL imponieren, sondern mit einer Verminderung. Eine andere Möglichkeit der Erklärung besteht darin, daß die Übergänge zwischen normalen T-Lymphozyten und den Lymphozyten bei der T-Zell-CLL in der Morphologie fließend sind, während zwischen normalen B-Lymphozyten und Lymphozyten bei B-Zell-CLL bei Auftreten der Erkrankung eine morphologisch faßbare Korrelation im Gehalt der Zellorganellen besteht.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Lymphozyten von Gesunden und von Patienten mit CLL wurden elektronenmikroskopisch-immunhistochemisch untersucht. Mit Hilfe Peroxidase-konjugierter spezifischer heterologer Antiseren wurden die Immunglobulin-Determinanten des B-Lymphozyten sowie spezifische Membranantigene des T-Lymphozyten dargestellt. Der Anteil der mit den verschiedenen Methoden dargestellten B- und T-Lymphozyten bei Gesunden und bei CLL-Patienten wird mitgeteilt. Durch die immunhistochemische Methodik lässt sich jede einzelne Zelle morphologisch beurteilen und gleichzeitig als B- oder T-Lymphozyt identifizieren. Die B-Zelleigenschaft von Lymphozyten ist bei Normalpersonen mit dem Gehalt an Ergastoplasmalamellen korreliert, die von T-Lymphozyten mit ihrem Gehalt an Zytosomen. Das Vorkommen einer B-Zell-CLL ist beim Lymphozyt mit seinem Gehalt an Mitochondrien, Zytosomen und Ergastoplasmalamellen korreliert. Das Vorkommen einer T-Zell-CLL ist beim Lymphozyt mit seinem Gehalt an Zytosomen korreliert.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABDOU N. I., N. L. ABDOU
Bone marrow: The bursa equivalent in man?
Science 175, 446 (1972)
2. AISENBERG A. C., K. J. BLOCH
Immunoglobulins on the surface of neoplastic
lymphocytes.
New Engl. J. Med. 287, 272 (1972)
3. AISENBERG A. C., K. J. BLOCH, J. C. LONG, R. B. COLVIN
Reaction of normal human lymphocytes and chronic lympho-
cytic leukemia cells with an antithymocyte serum.
Blood 41, 417 (1973)
4. AISENBERG A. C., K. J. BLOCH, J. C. LONG
Cell-surface immunoglobulins in chronic lymphocytic
leukemia and allied disorders.
Amer. J. Med. 55, 184 (1973)
5. AISENBERG A. C., J. C. LONG
Lymphocyte surface characteristics in malignant lymphoma.
Amer. J. Med. 58, 390 (1975)
6. AIUTI F., H. WIGZELL
Function and distribution pattern of human T lympho-
cytes. I. Production of anti-T lymphocyte specific
sera as estimated by cytotoxicity and elimination
of function of lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 13, 171 (1973)
7. AIUTI F., V. LACAVA, M. FIORILLI, M. V. CIARLA
Lymphocyte surface markers in lymphoproliferative
disorders.
Acta haemat., Basel, 50, 275 (1973)

8. AIUTI F., H. WIGZELL
Function and distribution pattern of human T lymphocytes. II. Presence of T lymphocytes in normal humans and in humans with various immunodeficiency disorders.
Clin. exp. Immunol. 13, 183 (1973)
9. AIUTI F., V. LACAVA, J. A. GAROFALO, R. D'AMELIO, C. D'ASERO
Surface markers on human lymphocytes: Studies of normal subjects and of patients with primary immunodeficiencies.
Clin. exp. Immunol. 15, 43 (1973)
10. AUGENER W., G. COHNEN, G. BRITTINGER
Binding of aggregated IgG by lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia.
Biomedicine Express 21, 6 (1974)
11. AVRAMEAS S.
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies.
Immunochemistry 6, 43 (1969)
12. AVRAMEAS S.
Immunoenzyme techniques: Enzymes as markers for the localization of antigens and antibodies.
Int. Rev. Cytol. 27, 349 (1970)
13. BASTEN A., J. F. A. P. MILLER, J. SPRENT, J. PYE
A receptor for antibody on B lymphocytes. I. Method of detection and functional significance.
J. exp. Med. 135, 610 (1972)

14. BASTEN A., J. SPRENT, J. F. A. P. MILLER
A receptor for antibody on B lymphocytes. II. Immuno-
chemical and electron microscopy characteristics.
J. exp. Med. 135, 627 (1972)
15. BASTEN A., J. F. A. P. MILLER, N. L. WARNER,
R. ABRAHAM, E. CHIA, E. J. GAMBLE
A subpopulation of T cells bearing Fc receptors.
J. Immunol. 115, 1159 (1975)
16. BENTWICH Z., S. D. DOUGLAS, F. P. SIEGAL, H. G. KUNKEL
Human lymphocyte-sheep erythrocyte rosette formation:
Some characteristics of the interaction.
Clin. Immunol. Immunopath. 1, 511 (1973)
17. BENTWICH Z., H. G. KUNKEL
Specific properties of human B and T lymphocytes
and alterations in disease.
Transplant. Rev. 16, 29 (1973)
18. BESSIS M.
Living blood cells and their ultrastructure.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 428 (1973)
19. BIANCO C., R. PATRICK, V. NUSSENZWEIG
A population of lymphocytes bearing a membrane re-
ceptor for antigen-antibody-complement complexes.
I. Separation and characterization.
J. exp. Med. 132, 702 (1970)
20. BOBROVE A. M., S. STROBER, L. A. HERZENBERG,
J. D. DEPAMPHILIS
Identification and quantitation of thymus-derived
lymphocytes in human peripheral blood.
J. Immunol. 112, 520 (1974)

21. BÖYUM A.
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97. Universitetsforlaget Oslo (1968)

22. BRITTINGER G., R. HIRSCHHORN, S. D. DOUGLAS,
G. WEISSMANN
Studies on lysosomes. XI. Characterization of a
hydrolase-rich fraction from human lymphocytes.
J. Cell Biol. 37, 394 (1968)

23. BRITTINGER G., E. KÖNIG, H. G. ABERLE
Lysosomale Enzyme in Lymphozyten. I. Lymphoretikuläre Erkrankungen: Vergleich des Enzymgehaltes (saure Phosphatase, β -Glucuronidase) unstimulierter Blutlymphozyten mit der Blastentransformation nach Phytohämagglutinin-Stimulierung in vitro.
Acta haemat., Basel, 44, 205 (1970)

24. BRITTINGER G., W. AUGENER, K. BREMER, G. COHNEN,
S. DABAG, K. FISCHER, E. KÖNIG, B. MEUSERS
Der Lymphozyt bei der chronischen lymphatischen Leukämie.
Blut 30, 293 (1975)

25. BRONDZ B. D.
Lymphocyte receptors and mechanisms of in vitro cell-mediated immune reactions.
Transplant. Rev. 10, 112 (1972)

26. BROUET J. C., L. PREUD'HOMME, M. SELIGMANN
The use of B and T membrane markers in the classification of human leukemias, with special reference to acute lymphoblastic leukemia.
Blood Cells 1, 81 (1975)

27. BROUET J. C., G. FLANDRIN, M. SASPORTES,
J. L. PREUD'HOMME, M. SELIGMANN
Chronic lymphocytic leukaemia of T-cell origin.
Lancet II, 890 (1975)

28. BROWN G., M. F. GREAVES
Cell surface markers for human T and B lymphocytes.
Europ. J. Immunol. 4, 302 (1974)

29. BROWN G., M. F. GREAVES, T. A. LISTER, N. RAPSON,
M. PAPAMICHAIL
Expression of human T and B lymphocyte cell-surface
markers on leukaemic cells.
Lancet I, 753 (1974)

30. BRUNNING R. D., J. PARKIN
Ultrastructural studies of parallel arrays in
human lymphocytes.
Amer. J. Path. 78, 59 (1975)

31. CATOVSKY D., E. MILIANI, A. OKOS, D. A. G. GALTON
Clinical significance of T-cells in chronic
lymphocytic leukaemia.
Lancet II, 751 (1974)

32. CATOVSKY D., J. GALETTO, A. OKOS, E. MILIANI,
D. A. G. GALTON
Cytochemical profile of B and T leukaemic lymphocytes
with special reference to acute lymphoblastic leukaemia.
J. clin. Path. 27, 767 (1974)

33. CHESS L., H. LEVINE, R. P. MAC DERMOTT, S. F. SCHLOSSMAN
Immunologic functions of isolated human lymphocyte
subpopulations. VI. Further characterization of the
surface Ig negative, rosette negative (null cell) subset.
J. Immunol. 115, 1483 (1975)

34. COHEN J., B. B. GILBERTSON
Human lymphocyte surface immunoglobulin capping.
J. clin. Invest. 55, 84 (1975)
35. COHNEN G.
Funktion und Oberflächenmarker menschlicher T- und B-Lymphozyten.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2241 (1974)
36. COHNEN G., W. AUGENER, A. BUKA, G. BRITTINGER
Rosette-forming lymphocytes in normals and in patients with malignant lymphomas.
Acta haemat., Basel, 51, 65 (1974)
37. COHNEN G.
Klinisch-diagnostische Bedeutung der Oberflächenmarker menschlicher T- und B-Lymphozyten.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2302 (1974)
38. COHNEN G.
T- und B-Lymphozyten bei chronischer lymphatischer Leukämie und Lymphogranulomatose. Elektronen-mikroskopische und immunologische Untersuchungen.
In: Veröffentlichungen aus der Pathologie, Heft 97, 56, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1975)
39. COOPER A. G., M. C. BROWN, H. A. DERBY, H. H. WORTIS
Quantitation of surface-membrane and intracellular gamma, mu and kappa chains of normal and neoplastic human lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 13, 487 (1973)
40. COOPER M. D., A. E. GABRIELSON, R. A. GOOD
Role of the thymus and the other central lymphoid tissues in immunological disease.
Ann. Rev. Med. 18, 113 (1967)

41. COOPER M. D., A. R. LAWTON, P. W. KINCADE
A two-stage model for development of antibody-producing cells.
Clin. exp. Immunol. 11, 143 (1972)
42. DAVIS S.
The variable pattern of circulating lymphocyte subpopulations in chronic lymphocytic leukemia.
New Engl. J. Med. 294, 1150 (1976)
43. DAVIS S.
Hypothesis: Differentiation of the human lymphoid system based on cell surface markers.
Blood 45, 871 (1975)
44. DICKLER H. B., H. G. KUNKEL
Interaction of aggregated gamma-globulin with B-lymphocytes.
J. exp. Med. 136, 191 (1972)
45. DICKLER H. B., F. P. SIEGAL, Z. H. BENTWICH, H. G. KUNKEL
Lymphocyte binding of aggregated IgG and surface Ig staining in chronic lymphocytic leukaemia.
Clin. exp. Immunol. 14, 97 (1973)
46. DICKLER H. B., N. F. ADKINSON JUN., W. D. TERRY
Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers.
Nature 247, 213 (1974)
47. DJALDETTI M., H. BESSLER, P. FISHMAN, I. MACHTEY
Functional and ultrastructural studies of sézary cells.
Nouvelle Revue Française d'Hématologie 15, 567 (1975)

48. DOCUMENTA GEIGY
Wissenschaftliche Tabellen
VI. Auflage, 170.2 und 170.23 (1960)
49. DOUGLAS S. D.
Human lymphocyte growth in vitro: Morphologic,
biochemical, and immunological significance.
Int. Rev. exp. Path. 10, 41 (1971)
50. DOUGLAS S. D., H. HUBER
Electron microscopic studies of human monocyte
and lymphocyte interaction with immunoglobulin-
and complement-coated erythrocytes.
Exp. Cell Res. 70, 161 (1972)
51. DOUGLAS S. D., G. COHNEN, E. KÖNIG, G. BRITTINGER
Lymphocyte lysosomes and lysosomal enzymes in chronic
lymphocytic leukemia.
Blood 41, 511 (1973)
52. EDELSON R. L., M. A. LUTZNER, C. M. KIRKPATRICK,
E. R. SHEVACH, I. GREEN
Morphologic and functional properties of the
atypical T lymphocyte of the Sézary syndrome.
Mayo Clin. Proc. 40, 558 (1974)
53. FAHEY J. L., A. P. HORBETT
Human gamma-globulin fractionation on anion
exchange cellulose columns.
J. Biol. Chem. 234, 2645 (1959)
54. FERNANDEZ L. A., J. M. MAC SWEEN, G. R. LANGLEY
Separation of T lymphocytes from normal individuals
and patients with B lymphocyte chronic lymphocytic
leukaemia.
Immunol. 28, 231 (1975)

55. FINK U., J. STREBEL, J. WEIG, F. SEPP, J. RASTETTER,
M. MÜLLER-BERAT
Rosettenformation bei Gesunden und bei Patienten
mit chronisch-lymphatischer Leukämie.
Verhdlg. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 543 (1973)
56. FLANDRIN G., J. C. BROUET
The Sézary cell: Cytologic, cytochemical, and
immunologic studies.
Mayo Clin. Proc. 49, 575 (1975)
57. FOULIS A. K., A. J. COCHRAN, J. R. ANDERSON
Surface immunoglobulins of leukaemic cells.
Clin. exp. Immunol. 14, 481 (1973)
58. FRÖLAND S. S., J. B. NATVIG, P. BERDAL
Surface-bound immunoglobulins as a marker of
B lymphocytes in man.
Nature New Biol. 234, 251 (1971)
59. FRÖLAND S. S.
Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes.
A probable marker for T lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 1, 269 (1972)
60. FRÖLAND S. S., J. B. NATVIG
Identification of three different human lymphocyte
populations by surface markers.
Transplant. Rev. 16, 114 (1973)
61. GONATAS N. K., J. O. ANTOINE, A. STIEBER, S. AVRAMEAS
Surface immunoglobulins of thymus and lymph node
cells demonstrated by the peroxidase coupling
technique.
Labor. Invest. 26, 253 (1972)

62. GOOD R. A., W. D. BIGGAR, B. H. PARK
Immunodeficiency diseases of man.
In: Amos B. (Ed), Progress in immunology.
Academic Press, New-York-London, 699 (1971)
63. GREAVES M. F., J. J. T. OWEN, M. C. RAFF
T and B lymphocytes. Origins, properties and
roles in immune responses.
Excerpta Medica, Amsterdam (1973)
64. GREY H. M., E. RABELLINO, B. PIROFSKY
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes.
IV. Distribution in hypogammaglobulinaemia, cellular
immune deficiency, and chronic lymphatic leukaemia.
J. clin. Invest. 50, 2368 (1971)
65. HUBER CH., G. MICHLMAYR, H. HUBER
Immunologische Marker in der Differentialdiagnose
lymphatischer Systemerkrankungen.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2262 (1974)
66. HUBER CH., E. DWORZAK, U. FINK, G. MICHLMAYR,
H. BRAUNSTEINER, H. HUBER
Receptor sites for aggregated gamma-globulin (AGG)
on lymphocytes in lymphoproliferative diseases.
Brit. J. Haemat. 27, 643 (1974)
67. HUBER H., G. MICHLMAYR, H. ASAMER, CH. HUBER,
H. BRAUNSTEINER
Die Differenzierung menschlicher Blutlymphozyten
mit immunologischen und autoradiographischen Me-
thoden. I. Ergebnisse bei Normalpersonen und bei
Patienten mit chronischer Lymphadenose.
Klin. Wschr. 50, 504 (1972)

68. HUHN D.
Über das Ergastoplasma von Lymphozyten des
peripheren Blutes.
Dtsch. med. Wschr. 93, 355 (1968)
69. HUHN D., W. STICH
Fine structure of blood and bone marrow.
An introduction to electron microscopic hematology.
J. F. Lehmanns Verlag, München, 36 (1969)
70. HUHN D.
Feinstruktur peripherer Lymphozyten bei chronischer
lymphatischer Leukämie.
Dtsch. med. Wschr. 16, 897 (1970)
71. HUHN D., H. RODT, S. THIERFELDER
Immunhistochemische Untersuchungen an Lymphozyten
der Maus.
Blut 28, 415 (1974)
72. HUHN D., H. RODT, S. THIERFELDER
Immunhistochemische Untersuchungen an Lymphozyten
der Maus. Markierung mit Anti-B-Zell- und Anti-T-Zell-
Globulin.
Blut 29, 332 (1974)
73. HUHN D., H. RODT, E. THIEL, U. FINK, W. RUPPELT
Elektronenmikroskopische und immunhistochemische
Untersuchungen an menschlichen Lymphozyten.
Blut 32, 87 (1976)
74. HUHN D., H. RODT, E. THIEL, H. GROSSE-WILDE,
U. FINK, G. JÄGER, C. STEIDLE, S. THIERFELDER
T-Zell-Leukämie des Erwachsenen.
Blut 33, 141 (1976)

75. INSEL R. A., F. M. MELEWICZ, M. F. LA VIA,
C. M. BALCH
Morphology, surface markers, and in vitro
responses of a human leukemic T cell.
Clin. exp. Immunol. 40, 382 (1975)
76. ISHII Y., H. UENO, K. KIKUCHI
Ultrastructure of lymphoid cells with surface-
bound immunoglobulin in rats.
J. reticuloendoth. Soc. 15, 155 (1974)
77. ISHII Y., H. KOSHIBA, H. UENO, I. MAEYAMA,
T. TAKAMI, F. ISHIBASHI, K. KIKUCHI
Characterization of human B lymphocyte specific
antigens.
J. Immunol. 114, 466 (1975)
78. JONDAL M., G. HOHN, H. WIGZELL
Surface markers on human T- and B-lymphocytes.
I. A large population of lymphocytes forming
nonimmune rosettes with sheep red blood cells.
J. exp. Med. 136, 207 (1972)
79. KARNOVSKY M. J.
The ultrastructural basis of capillary per-
meability studied with peroxidase as a tracer.
J. Cell Biol. 35, 213 (1967)
80. KERSEY J. H., K. J. GAJL-PECZALSKA
T and B lymphocytes in humans.
Amer. J. Path. 81, 446 (1975)
81. KLEIN E., T. ESKELAND, M. INOUE, R. STROM,
B. JOHANNSSON
Surface immunoglobulin-moieties on lymphoid cells.
Exp. Cell Res. 62, 133 (1970)

82. KÖNIG E.
Lysosomen und lysosomale Enzyme in Blutlymphozyten
von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukä-
mie (CLL) vor und nach Phytomitogenstimulierung in
vitro.
Habilit. Schrift, Essen (1974)
83. LILLE I., A. DESPLACES, L. MEEUS, R. T. SARACINO,
J. C. BROUET
Thymus-derived proliferating lymphocytes in chronic
lymphocytic leukaemia.
Lancet II, 263 (1973)
84. LOBO P. I., F. B. WESTERVELT, D. A. HORWITZ
Identification of two populations of immuno-
globulin-bearing lymphocytes in man.
J. Immunol. 114, 116 (1975)
85. MC LAUGHLIN H., G. WETHERLY-MEIN, C. FITCHER, J. M. HOBBS
Non-immunoglobulin-bearing 'B' lymphocytes in
chronic lymphatic leukaemia?
Brit. J. Haemat. 25, 7 (1973)
86. MEUWISSEN H. J., O. STUTMAN, R. A. GOOD
Functions of the lymphocytes.
Semin. Hemat. 6, 28 (1969)
87. MICHELMAYR G., H. HUBER
Receptor sites for complement on certain human
peripheral blood lymphocytes.
J. Immunol. 105, 670 (1970)
88. MILLER J. F. A. P.
The thymus and the immune system.
Vox sang. 20, 481 (1971)

89. MILLS B., L. SEN, L. BORELLA
Reactivity of antihuman thymocyte serum with
acute leukemic blasts.
J. Immunol. 115, 1038 (1975)
90. NATH I., J. CURTIS, A. MANGALIK, G. P. TALWAR
Lymphocytes derived of T and B cell markers in
chronic lymphatic leukemia.
Acta haemat. 53, 37 (1975)
91. NOSSAL G. J. V., G. L. ADA
Antigens, lymphoid cells, and the immune response.
Academic Press, New York-London (1971)
92. PALADE G. E.
A study of fixation for electron microscopy.
J. exp. Med. 95, 285 (1952)
93. PAPAMICHAIL M., E. J. HOLBOROW, H. J. KEITH,
H. C. F. CURRY
Subpopulations of human peripheral blood
lymphocytes distinguished by combined rosette
formation and membrane immunofluorescence.
Lancet II, 64 (1972)
94. PERLMANN P., H. PERLMANN, H. J. MÜLLER-EBERHARD
Cytolytic lymphocytic cells with complement recep-
tor in human blood. Induction of cytolysis by IgG
antibody but not by target cell-bound C 3.
J. exp. Med. 141, 287 (1975)
95. PERNIS B., L. FORNI, L. AMANTE
Immunoglobulin spots on the surface of rabbit
lymphocytes.
J. exp. Med. 132, 1001 (1970)

96. PERNIS B., M. FERRARINI, L. FORNI, L. AMANTE
Immunoglobulins on lymphocyte membranes.
In: Amos B. (Ed), *Progress in immunology*.
Academic Press, New York-London, 95 (1971)
97. PIESSENS W. F., P. H. SCHUR, W. C. MOLONEY,
W. H. CHURCHILL
Lymphocyte surface immunoglobulins. Distribution
and frequency in lymphoproliferative diseases.
New Engl. J. Med. 288, 176 (1973)
98. PINCUS S., C. BIANCO, V. NUSSENZWEIG
Increased proportion of complement-receptor
lymphocytes in the peripheral blood of
patients with chronic lymphocytic leukemia.
Blood 40, 303 (1972)
99. PIPER W.
Innere Medizin
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 410 (1974)
100. PREUD'HOMME J. L., M. SELIGMANN
Anti-human immunoglobulin G activity of membrane-
bound monoclonal immunoglobulin M in lymphopro-
liferative disorders.
Proc. nat. Acad. Sci. 69, 2132 (1972)
101. PREUD'HOMME J. L., M. SELIGMANN
Surface bound immunoglobulins as a cell marker
in human lymphoproliferative diseases.
Blood 40, 777 (1972)
102. RABELLINO E., S. COLON, H. M. GREY, E. R. UNANUE
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes.
I. Distribution and quantitation.
J. exp. Med. 133, 156 (1971)

103. RAFF M. C.
Two distinct populations of peripheral lymphocytes
in mice distinguishable by immunofluorescence.
Immunol. 19, 637 (1970)
104. RAFF M. C.
T and B lymphocytes in mice studied by using
antisera against surface antigenic markers.
Amer. J. Path. 65, 467 (1971)
105. RAFF M. C.
T and B lymphocytes and immune response.
Nature 242, 19 (1973)
106. REYES F., J. L. LEJONG, M. F. GOURDIN,
P. MANNONI, B. DREYFUS
The surface morphology of human B lymphocytes
as revealed by immunoelectron microscopy.
J. exp. Med. 14, 392 (1975)
107. REYNOLDS E. S.
The use of lead citrate at high pH as an
electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 208 (1963)
108. RICK W.
Klinische Chemie und Mikroskopie.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,
3. Auflage, 78 (1974)
109. RIEBER E. P., G. RIETHMÜLLER
Surface immunoglobulin on thymus cells.
I. Increased immunogenicity of heterologous
anti-Ig bound to thymus cells.
Z. Immun. Forsch. 147, 262 (1974)

110. RITZMANN S. E., J. C. DANIELS, H. SAKAI,
G. A. BEATHARD
The lymphocyte in immunobiology.
Ann. Allergy 31, 109 (1973)
111. RODT H., S. THIERFELDER, E. THIEL, D. GÖTZE,
B. NETZEL, D. HUHN, M. EULITZ
Identification and quantitation of human T-cell
antigen by antisera purified from antibodies
cross-reacting with hemopoetic progenitors and
other blood cells.
Immunogenetics 2, 411 (1975)
112. ROITT I. M., M. F. GREAVES, G. TORRIGIANI,
J. BROSTOFF, J. H. L. PLAYFAIR
The cellular basis of immunological responses.
Lancet II, 367 (1969)
113. ROSS G. D., E. M. RABELLINO, M. J. POLLEY, H. M. GREY
Combined studies of complement receptor and surface
immunoglobulin-bearing cells and sheep erythrocyte
rosette-forming cells in normal and leukemic human
lymphocytes.
J. clin. Invest. 52, 377 (1973)
114. ROSS G. D., M. J. POLLEY, E. M. RABELLINO, H. M. GREY
Two different complement receptors on human lympho-
cytes. One specific for C 3b and one specific for
C 3b inactivator-cleaved C 3b.
J. exp. Med. 138, 798 (1973)
115. RUBIN B., B. HERTEL-WULFF
Biological significance of Fc-receptor-bearing
cells among activated T lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 4, 451 (1975)

116. SABATINI D. D., K. BENSCH, R. J. BARNETT
Cytochemistry and electron microscopy. The
preservation of cellular ultrastructure and
enzymatic activity by aldehyde fixation.
J. Cell Biol. 17, 19 (1963)
117. SAGONE A. L., S. G. MURPHY
The chronic lymphatic leukemia lymphocyte:
Correlation of functional, metabolic, and
surface immunoglobulin characteristics.
Cell. Immunol. 18, 1 (1975)
118. SANDILANDS G. P., A. COONEY, R. M. GRANT,
K. GRAY, J. D. BROWNING, J. R. ANDERSON
Lymphocytes with T and B cell properties
in a lymphoproliferative disorder.
Lancet II, 903 (1974)
119. SCHREK R.
Ultrastructure of blood lymphocytes from chronic
lymphocytic and lymphosarcoma cell leukemia.
J. nat. Cancer Inst. 48, 51 (1972)
120. SCHUMACHER H. R., T. K. MAUGEL, K. D. DAVIS
The lymphocyte of chronic lymphatic leukemia.
I. Electron microscopy-onset.
Cancer 26, 895 (1970)
121. SEILER F. R., H. H. SEDLACEK, E. J. KANZY, W. LANG
Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweis-
methoden zur Differenzierung funktionell ver-
schiedener Lymphozyten: Spontanrosetten, Komple-
mentrezeptor-Rosetten und Immunglobulinrezeptoren.
Behring Inst. Mitt. 52, 26 (1972)

122. SELIGMANN M., J. L. PREUD'HOMME, J. C. BROUET
B and T cell markers in human proliferative blood
diseases and primary immunodeficiencies, with
special reference to membrane bound immunoglobulins.
Transplant. Rev. 16, 85 (1973)
123. SELIGMANN M.
Membrane cell markers in human leukaemias and
lymphomas.
Brit. J. Haemat. 31, 1 (1975)
124. SHEVACH E. M., R. HERBERMANN, M. M. FRANK, I. GREEN
Receptors for complement and immunoglobulin on human
leukemic cells and human lymphoblastoid cell lines.
J. clin. Invest. 51, 1933 (1972)
125. SHEVACH E. M., E. S. JAFFE, I. GREEN
Receptor for complement and immunoglobulin on
human and animal lymphoid cells.
Transplant. Rev. 16, 3 (1973)
126. SHEVACH E. M., R. EDELSON, M. FRANK, M. LUTZNER,
I. GREEN
A human leukemia cell with both B and T cell
surface receptors.
Proc. nat. Acad. Sci. 71, 863 (1974)
127. SILBERMAN S., R. SCHREK
Surface immunoglobulins of lymphocytes in chronic
lymphocytic leukemia and disseminated lymphosarcoma.
Exp. molec. Path. 20, 33 (1974)
128. SMITH R. W., W. D. TERRY, D. N. BUELL, K. W. SELL
An antigenic marker for human thymic lymphocytes.
J. Immunol. 110, 884 (1973)

129. SPURLOCK B. O., V. C. KATTINE, J. A. FREEMAN
Technical modifications in Maraglas embedding.
J. Cell Biol. 17, 203 (1963)
130. STACHER A., R. WALDNER, H. THEML
Klinik der malignen Non-Hodgkin-Lymphome entsprechend der Kieler Klassifikation: Immunozytom und chronisch lymphatische Leukämie.
Hämatologen-Kongreß, Bad Nauheim (1975)
131. STATHOPOULOS G., M. PAPAMICHAIL, D. CATOVSKY, A. J. DAVIES, E. J. HOLBOROW, E. WILTSHAW
Immunological studies in a case of T-cell leukaemia.
J. clin. Path. 27, 851 (1974)
132. STEIN H., S. DRESCHER
Darstellung von Oberflächen-IgM an Blutlymphozyten mit der Immuno-Peroxydase-Methode.
Blut 26, 35 (1973)
133. STEIN H.
Klassifikation der malignen Non-Hodgkin-Lymphome aufgrund gemeinsamer morphologischer und immunologischer Merkmale zwischen normalen und neoplastischen Zellen.
Immunität und Infektion, 2, 52 (1976)
134. SUMIYA M., H. MIZOGUCHI, K. KOSAKA, Y. MIURA, F. TAKAKU, J. L. YATA
Chronic lymphocytic leukaemia of T-cell origin?
Lancet II, 910 (1973)

135. THIEL E., H. RODT, D. HUHN, S. THIERFELDER
Decrease and altered distribution of human T-antigen
on chronic lymphatic leukaemia cells of T-type
referring to clonal origin.
Blood 47, 723 (1976)
136. THUNG Y. H., R. A. BINDER, L. Z. SVERLAK, J. A. BELLANTI
Functional studies of T and B lymphocytes in
patients with chronic lymphocytic leukemia.
South. Med. J. 67, 138 (1974)
137. UNANUE E. R., H. M. GREY, E. RABELLINO, P. CAMPBELL,
J. SCHMIDTKE
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes.
II. The bone marrow as the main source of lympho-
cytes with detectable surface-bound immunoglobulin.
J. exp. Med. 133, 1188 (1971)
138. UNANUE E. R., W. D. PERKINS, M. J. KARNOVSKY
Ligand-induced movement of lymphocyte membrane
macromolecules. I. Analysis by immunofluorescence
and ultrastructural radioautography.
J. exp. Med. 136, 885 (1972)
139. WATSON M. L.
Staining of tissue sections for electron microscopy
with heavy metals.
J. Biophys. biochem. Cytol. 4, 475 (1958)
140. WIGZELL H.
The functional significance of surface structures
on lymphocytes.
Ann. Immunol. 124 c, 7 (1973).

141. WILSON J. D., G. J. V. NOSSAL
Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphatic leukaemia.
Lancet II, 788 (1971)
142. WINCHESTER R. J., S. M. FU, T. HOFFMAN, H. G. KUNKEL
IgG on lymphocyte surfaces; technical problems and the significance of a third cell population.
J. Immunol. 114, 1210 (1975)
143. WYBRAN J., M. C. CARR, H. H. FUDENBERG
The human rosette-forming cell as a marker of a population of thymus-derived cells.
J. clin. Invest. 51, 2537 (1972)
144. WYBRAN J., S. CHANTLER, H. H. FUDENBERG
Isolation of normal T cells in chronic lymphatic leukemia.
Lancet I, 126 (1973)
145. YODOI J., K. TAKATSUKI, T. MASUDA
Two cases of T-cell chronic lymphocytic leukemia in Japan.
New Engl. J. Med. 290, 572 (1974)
146. ZUCKER-FRANKLIN D.
The ultrastructure of lymphocytes.
Sem. Hemat. 6, 4 (1969)
147. ZUCKER-FRANKLIN D., J. W. MELTON III, F. QUAGLIATA
Ultrastructural, immunologic, and functional studies of Sézary cells: A neoplastic variant of thymus-derived (T) lymphocytes.
Proc. nat. Acad. Sci. 71, 1877 (1975)

148. ZUCKER-FRANKLIN D.

Cellular structure and function in normal and neoplastic lymphoid cells.

Arch. Intern. Med. 135, 55 (1975)

149. ZULS H. M., R. T. KUBO, J. C. CEROTTINI

Thymus-derived (T) cell immunoglobulins. Presence of a receptor site for IgG and absence of large amounts of "buried" Ig determinants on T cells.

J. exp. Med. 136, 1323 (1972)

150. ZUNT S. V., A. F. WILLIAMS

The origin of cell surface immunoglobulin of marrow-derived and thymus-derived lymphocytes of the rat.

J. exp. Med. 139, 479 (1974)

Für die freundliche Überlassung des Themas der Doktorarbeit und die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. med. D. Huhn herzlich danken.

Frau Dr. med. G. Jäger vom Institut für Hämatologie in München danke ich für viele wertvolle Ratschläge und Herrn Dr. med. H. Rodt für die Zurverfügungstellung der Antiseren.

Frl. M. Darsow und Frl. G. Wochinger bin ich für die freundliche Unterweisung und Mithilfe bei der Laborarbeit, sowie die hervorragende Einweisung in die Elektronenmikroskopie zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Am 30. 10. 1952 wurde ich, Angelika Regina Kreppel, geborene Helmbrecht als Tochter des Kaufmanns Rolf Helmbrecht und seiner Ehefrau Jolanda, geborene Wipprecht in München geboren.

Von 1959 bis 1963 besuchte ich die evangelische Volksschule an der Ichostraße in München und von 1963 bis 1972 das Städtische Theodolindengymnasium für Mädchen/neusprachlicher Zweig in München, wo ich am 23. 6. 1972 mit dem Zeugnis der Reife abschloß.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München.

Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich am 27. 8. 1974 in München, den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 29. 8. 1975 in München und den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 26. 8. 1977 in München.

Am 14. 8. 1978 schloß ich mit dem Diplom-Ingenieur der Elektrotechnik Christian-Peter Kreppel in Ottobrunn die Ehe.

Die Ärztliche Prüfung bestand ich am 31. 10. 1978 in München, die Approbation als Arzt erhielt ich am 6. 11. 1978.

